

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

Effetti di una auxina sulla crescita e composizione della microalga verde
Desmodesmus communis

Tesi di laurea in Botanica marina applicata

Relatore

Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da

Cinzia Draghin

Correlatore

Dott.ssa Matilde Mazzotti

(III sessione)

Anno accademico 2012-2013

INDICE

CAPITOLO 1

Introduzione	7
1.1 Sistemi di coltivazione	9
1.1.1 Sistemi aperti.....	9
1.1.2 Sistemi chiusi	13
1.1.3 Comparazione tra sistemi aperti e sistemi chiusi	16
1.2 Raccolta della biomassa algale	17
1.3 Applicazioni commerciali della biomassa microalgale	19
1.3.1 Nutraceutica e mangimistica	19
1.4 Microalghe ed energia	20
1.4.1 Biocarburanti	20
1.4.2 Biodiesel da microalghe	22
1.4.3 Biorisanamento e Bioraffinerie	25
1.5 Conversione della biomassa algale	26

CAPITOLO 2

2.1 Biochimica e fisiologia delle microalghe	29
2.1.1 Fasi di crescita microalgale	29
2.2 Biochimica dei lipidi	30
2.2.1 Composizione chimica del Biodiesel	31
2.3 Nutrienti	34
2.4 Identificazione di <i>Desmodesmus communis</i>	35
2.5 Ormoni	37
2.5.1 Auxine	38
2.5.2 Citochine	40

2.5.3	Gibberelline.....	41
2.5.4	Acido Abscissico.....	42
2.5.5	Etilene	43
2.5.6	Composti ormono-simili	44
2.6	Scopo della tesi	46

CAPITOLO 3

3.1	Materiali e metodi	47
3.1.1	Screening preliminare	47
3.1.1.1	Allestimento delle colture	47
3.1.2	Esperimento in colture batch	48
3.1.2.1	Allestimento delle colture	48
3.1.3	Esperimento in fotobioreattore	50
3.1.3.1	Allestimento delle colture	50
3.2	Determinazione del peso secco	52
3.3	Conteggio cellulare	52
3.4	Determinazione della torbidità	52
3.5	Misurazione del pH	53
3.6	Valutazione dell'efficienza fotosintetica	53
3.6.1	Relazione tra intensità luminosa e processo fotosintetico	56
3.7	Quantificazione della biomassa cellulare	57
3.8	Determinazione di ammonio e nitrati	58
3.9	Determinazione del fosforo reattivo e del fosforo totale	58
3.10	Analisi elementare CHNSO	59
3.11	Determinazione del contenuto di clorofilla <i>a</i>	59
3.12	Determinazione del contenuto proteico	60
3.13	Determinazione del contenuto polisaccaridico	60
3.14	Determinazione del contenuto lipidico	61

CAPITOLO 4

4.1	Risultati e discussioni	63
4.1.1	Screening preliminare	63
4.1.2	Conclusioni	65
4.2	Esperimento in colture batch	66
4.2.1	Valutazione della biomassa cellulare	66
4.2.2	Assorbimento dei nutrienti	69
4.2.3	Efficienza fotosintetica.....	70
4.2.4	Composizione molecolare	72
4.2.5	Contenuto cellulare.....	73
4.2.6	Conclusioni.....	74
4.3	Esperimento in fotobioreattore	75
4.3.1	Valutazione della biomassa algale	75
4.3.2	Assimilazione dei nutrienti.....	76
4.3.3	Efficienza fotosintetica.....	77
4.3.4	Composizione molecolare	77
4.3.5	Contenuto cellulare.....	80
4.3.6	Conclusioni.....	82
4.4	Conclusioni generali	83
5	Bibliografia	85

Introduzione

Le microalghe sono coltivate al fine di produrre biomassa per ottenere prodotti e processi utili (alimenti, integratori, biocarburanti, depurazione delle acque) e nuovi studi e miglioramenti in campo tecnologico aprono la strada a nuove possibili applicazioni. Le microalghe sono organismi unicellulari fotosintetici, dotate di un'organizzazione strutturale molto semplice, che utilizzano l'energia luminosa, l'anidride carbonica e le sostanze nutritive disciolte nell'acqua per la sintesi di molecole complesse. Possono vivere in acque dolci, salmastre o salate e comprendono una grande varietà di specie adattate a condizioni molto diverse; hanno la stessa composizione chimica delle piante, variabile da specie a specie, ma con la capacità di moltiplicarsi (con un tempo di duplicazione anche di 24h) e raggiungere densità di biomassa molto superiori. Con il termine microalghe non si intendono solo microorganismi eucarioti di origine vegetale, ma in senso più ampio si comprendono anche i microorganismi procarioti con fotosintesi ossigenica, quali i cianobatteri. I primi utilizzi delle microalghe, in particolare di *Arthrospira platensis* (*Spirulina*), sono storicamente noti fin dal XVI secolo; la prima coltivazione documentata risale al 1890 ad opera di Beijerinck che riuscì ad isolare *Chlorella* spp., ad oggi genere più utilizzato a scopi commerciali. Dalla fine della seconda guerra mondiale eventi quali l'aumento della popolazione, la previsione di un apporto nutrizionale insufficiente e le nuove conoscenze riguardanti la fisiologia e la biochimica di queste alghe hanno portato ad utilizzare a livello industriale la biomassa algale. La coltivazione su scala industriale è avvenuta a partire dai primi anni '60 in Giappone con l'avvio di piccole imprese commerciali che utilizzavano la microalga verde *Chlorella* spp. (Iwamoto, 2004) e dagli anni '70, attraverso la creazione del primo grande impianto di coltivazione di *Spirulina* in Messico (Borowitzka, 1999, Muller-Feuga, 1996). Dagli anni '80 la diffusione di questi sistemi diventa globale; attualmente, esistono più di 46 grandi impianti in Asia, che arrivano a produrre un quantitativo di 1000 kg annui di biomassa algale, (soprattutto *Chlorella* spp.). In soli 30 anni le biotecnologie si sono evolute e diversificate in maniera sostanziale e significativa: attualmente, il mercato della biomassa microalgale produce circa 5000 t di sostanza secca/anno generando un fatturato di circa US \$ $1,25 \times 10^9$ /anno (ad esclusione dei prodotti trasformati) (Becker, 2007). Tuttavia, anche se diversi ceppi

algali sono coltivati universalmente per scopi diversi, la maggior parte della produzione annuale di biomassa è rappresentata però da sole quattro specie: il cianobatterio *Arthrospira platensis* (Spirulina) e le microalghe verdi *Chlorella* spp., *Dunaliella salina* ed *Haematococcus pluvialis*.

1.1 Sistemi di coltivazione

La produzione di biomassa da microalghe avviene attraverso l'utilizzo di sistemi di coltivazione industriale; la crescita microalgale si basa sul semplice meccanismo mostrato di seguito che determina quali siano tutti i requisiti necessari perché avvenga questo processo biologico:



In condizioni naturali la crescita degli organismi fotosintetici richiede luce solare come fonte di energia, carbonio inorganico come fonte di carbonio, acqua e nutrienti inorganici. In biotecnologia, la produzione di biomassa richiede quindi condizioni ben definite, anche per ridurre al minimo il costo: è necessario, per quanto possibile, cercare di riprodurre le condizioni ottimali di crescita naturali, contando su luce solare o artificiale liberamente disponibile, una temperatura e pH adatti e un apporto sufficiente ed adeguato di carbonio e sostanze nutritive (azoto, fosforo, ferro e in alcuni casi silicio) (Chisti, 2007) nel mezzo di crescita. I metodi di coltivazione su larga scala avvengono mediante due tecniche differenti: sistemi aperti (open ponds) e sistemi chiusi (fotobioreattori).

1.1.1 Sistemi aperti

Storicamente l'utilizzo di sistemi aperti per la coltivazione intensiva di microalghe è noto dagli anni '50 (Borowitzka, 1999). A livello industriale sono i maggiormente utilizzati, grazie alla semplicità di gestione, operatività, i costi contenuti di costruzione e di esercizio. Esistono differenti tipologie di sistemi aperti, caratterizzati da diverse forme, dimensioni, materiali (i più comuni sono rappresentati da calcestruzzo, fibra di vetro e cloruro di polivinile (PVC)), livello di inclinazione e agitazione della massa acquosa. Le vasche più semplici, come i bacini idrici naturali (**Fig. 1a**), permettono alle microalghe di crescere come farebbero in natura: sospese nella colonna d'acqua, il rimescolamento è essenzialmente ad opera del vento. Questi impianti poco profondi occupano uno spazio pari a circa 50 ha; tuttavia la loro produttività risulta essere piuttosto esigua ($\sim 1 \text{ g DM m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ dry weight), a causa della carenza di anidride carbonica assorbita solo attraverso la superficie aperta dell'impianto (Torzillo e Masojidek, 2008). Perché si abbia una distribuzione omogenea di questa, è necessario ricorrere ad un meccanismo di agitazione della vasca. Con questo sistema è solitamente coltivata la microalga verde *Dunaliella*

salina per l'estrazione di β -carotene in Australia occidentale e in California. I principali sistemi artificiali che sono stati sviluppati per operare su larga scala, sono rappresentati da vasche circolari con un braccio meccanico atto al rimescolamento, sistemi inclinati, dove la miscelazione è operata da un sistema di pompe e dalla forza di gravità e vasche a "circuito" (*Raceway ponds*) in cui la coltura algale compie un percorso chiuso ed è agitata da pale rotanti.

1. Le **vasche circolari (Fig.1b)** hanno un diametro fino a 45 m, una profondità che varia dai 30 ai 70 cm e l'agitatore meccanico è posto al centro del sistema. Questi sono considerati i meno convenienti dal punto di vista della produzione di biomassa a livello industriale, in quanto richiedono costi elevati di costruzione e di spesa energetica per la miscelazione. Questa tipologia di vasca può essere utilizzata in combinazione al trattamento delle acque reflue (Sheehan et al., 1998). Uno dei primi sistemi all'aperto con agitazione è stata una vasca circolare, sviluppata in Giappone negli anni '50, per coltivare in maniera intensiva la microalga verde *Chlorella* spp. (Tamiya, 1957) e successivamente utilizzata dagli anni '60 per la sua produzione commerciale. Tutt'ora questa microalga e il cianobatterio *Spirulina*, sono coltivate attraverso l'impiego di questo sistema anche in Thailandia, Taiwan, California, Hawaii, India e Cina.
2. Nei **sistemi inclinati (Fig. 1c)** la coltura microalgale fluisce su più piani inclinati disposti a cascata; gli strati inferiori sono al massimo di 1 cm di spessore, in modo da consentire una turbolenza continua ed evitare che le cellule più superficiali ombreggino quelle sottostanti. La fonte luminosa ha un brevissimo cammino ottico favorendo il raggiungimento di elevate concentrazioni cellulari (tra i 25g/L- 30g/L per unità). Grazie a questo sistema è possibile ottenere un'elevata produttività giornaliera ($40\text{g DM m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ dry weight), anche in condizioni climatiche temperate. Tuttavia questi sistemi sono caratterizzati da diverse problematiche come la cospicua sedimentazione cellulare, elevata evaporazione e perdita di anidride carbonica superficiale e un grande consumo energetico a causa della necessità di un continuo pompaggio nel sistema (Borowitzka, 1999). Questi svantaggi determinano un maggior costo nella loro costruzione e una minor efficienza rispetto ai sistemi aperti tradizionali.

3. I sistemi ***Raceway*** (**Fig.1d**) sono i più diffusi ed utilizzati grazie ai costi contenuti di costruzione e manutenzione. Sono vasche poco profonde il cui rimescolamento avviene ad opera di agitatori elettromeccanici in continuo movimento (Oswald e Golueke, 1960). In questo modo si evita la sedimentazione, favorendo la sospensione cellulare ed esponendo periodicamente le alghe alla luce; infatti la bassa profondità di questi sistemi permette alla radiazione luminosa di penetrare nell'acqua più diffusamente ed essere efficientemente assorbita dalle microalghe. I nutrienti e l'anidride carbonica sono costantemente introdotti ad un'estremità, solitamente davanti all'agitatore, mentre dall'altra estremità viene prelevata la soluzione contenente le microalghe da sottoporre a trattamento. La presenza di anidride carbonica derivante dall'aria è sufficiente, ma è possibile installare aeratori sommersi per raggiungere parametri chimici ottimali per la specie coltivata.





Fig.1 Esempi di sistemi di coltivazione industriale all'aperto della biomassa algale. (a) La colorazione rossastra di questo bacino idrico naturale nella baia di San Francisco (California) è dovuta alla presenza di *Dunaliella salina*; (b) Vasche circolari per la coltivazione di *Chlorella* spp. a Yaeyama, Giappone del sud; (c) Sistemi inclinati disposti a cascata (3 moduli di 2200L ciascuno) presso l'Istituto di Microbiologia, Accademia delle Scienze (Třeboň, Repubblica Ceca); (d) Sistemi Raceway presso la Kentucky State University (Frankfort, U.S.A.).

I sistemi all'aperto sono sensibili alle variazioni climatiche, difatti sono adatti solo per climi tropicali e subtropicali; risentono notevolmente del fenomeno dell'evaporazione che rende questo sistema poco efficiente nell'utilizzo delle risorse idriche che devono essere abbondanti. Altro svantaggio è la necessità di reperire ampie aree di coltivazione e quindi di volumi da trattare, comportando un aumento del costo del terreno e della separazione della biomassa dalla massa acquosa; la minor efficienza della fotosintesi e della distribuzione di anidride carbonica sono da considerarsi come altre problematiche. La densità algale è piuttosto contenuta e questo può facilitare la contaminazione da parte di altri microorganismi. Questi sistemi sono quindi adatti solo per un numero limitato di specie, che crescono rapidamente e in condizioni molto selettive.

1.1.2 Sistemi chiusi

Solitamente definiti fotobioreattori ne esistono di diverso tipo e si differenziano per il design, l'operatività e il materiale di costruzione. Maggiormente diffusi sono i fotobioreattori a pannelli orizzontali (flat plates), fotobioreattori tubolari e a colonna. Contrariamente ai sistemi aperti permettono la crescita di molte specie algali, evitando contaminazioni esterne e consentono uno stretto controllo sui parametri chimico-fisici e biologici della coltura, favorendo una produttività maggiore ($50-200 \text{ g DW m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Grobbelar, 2009)) e una raccolta più semplice. La progettazione e la costruzione di queste strutture deve tener conto di diverse variabili operative che determinino la migliore prestazione di questi sistemi. La forma e il materiale di costruzione definisce le caratteristiche meccaniche del sistema; è necessario quindi tener conto delle pressioni in gioco in modo da evitare perdite di liquido o cedimenti strutturali. La dimensione del reattore è proporzionale alla superficie ricevente l'energia luminosa che inoltre, permette uno scambio termico con l'esterno, influenzando la temperatura del sistema. Il raffreddamento di questo può essere ottenuto attraverso l'immersione dei tubi in una vasca piena d'acqua, spruzzando acqua sulla superficie degli stessi o utilizzando scambiatori di calore. La fonte luminosa può essere naturale o artificiale ed in questo caso è necessario regolare l'intensità luminosa ad un'appropriata lunghezza d'onda e definire il suo alloggiamento in base al ceppo algale selezionato. Temperatura e intensità luminosa inoltre dipendono dal luogo in cui sono disposti i fotobioreattori: in ambienti chiusi come serre si hanno coltivazioni indoor, diversamente si parla di coltivazioni outdoor che richiedono spazio notevolmente ridotto rispetto ai sistemi aperti. La sospensione microalgale scorre continuamente all'interno di tubi trasparenti o bobine flessibili di materiale diverso (acrilico, fibra di vetro, plexiglas) che fungono da collettori solari. I tubi generalmente, sono disposti orizzontalmente o verticalmente e possono essere organizzati come una struttura serpentina o posizionati in serie in modo da formare un unico collettore. In questo modo è possibile ottenere una maggiore densità di biomassa rispetto ai sistemi aperti. La sospensione viene fatta circolare attraverso l'impiego di pompe a membrana, più efficienti rispetto a pompe centrifughe, in quanto il movimento peristaltico verso l'alto provoca meno stress meccanico alle cellule; oppure attraverso insufflazione di aria o di una miscela di aria/CO₂. La miscelazione rimescola la coltura omogeneizzando l'illuminazione e i nutrienti disciolti, inoltre permette un maggior controllo del pH. Un'eccessiva produzione

di ossigeno può portare a fotossidazione e per evitare fenomeni di questo tipo è utile degassare la massa acquosa della coltura. I fotobioreattori collocati all'aperto sono generalmente strutturati in moduli. Ad oggi il più grande impianto costruito è all'interno di una serra a Klötze, Germania, con un volume totale di 700 m³ (20 moduli di 35 m³) (Torzillo e Masojidek, 2008).

1. Fotobioreattori *flat plates*

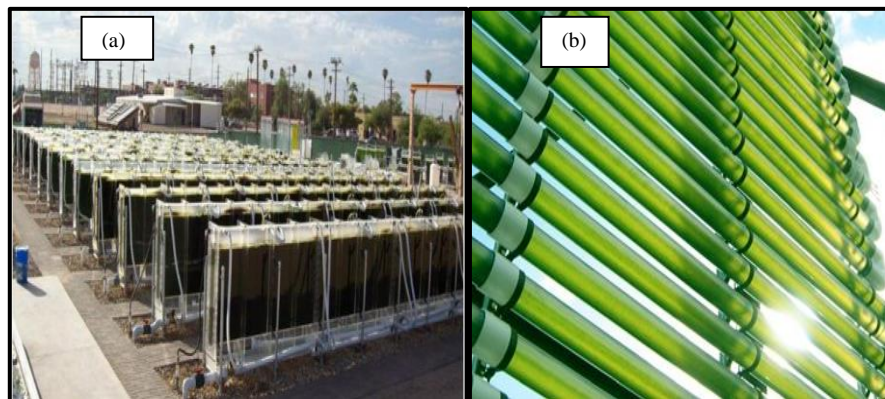
Sono formati dall'unione di due pannelli di vetro, plastica trasparente o polycarbonato alveolare opportunamente distanziati tra loro; in questo modo si ottiene una piastra sottile (il cui spessore è tra i 4-8 cm) al cui interno fluisce la coltura microalgale (**Fig. 2a**). Il mescolamento di questa avviene grazie all'anidride carbonica insufflata, riducendo al minimo eventuali stress meccanici e costi energetici suppletivi derivanti da un'agitazione meccanica. Inoltre l'accumulo di ossigeno rispetto ad altri fotobioreattori è ridotto. Possono avere un orientamento orizzontale, inclinato o verticale e hanno un elevato rapporto superficie-volume. Grazie al breve percorso compiuto dalla luce sono in grado di rendere un'elevata produttività volumetrica (produttività per unità di volume del reattore kg m⁻³ d⁻¹). Rispetto ai fotobioreattori tubolari hanno tuttavia maggiori svantaggi quali il controllo della temperatura, il degassamento dell'ossigeno e la difficoltà di pulizia dovuto al biofouling (accumulo e deposito cellulare che può compromettere la funzionalità di una struttura), provocato dalla bassa turbolenza presente.

2. Fotobioreattori tubolari

Consistono in una serie di tubi trasparenti (3-6 cm di diametro), di vetro o plastica, al cui interno scorre la coltura algale (**Fig. 2b**). I tubi devono essere esposti alla luce, che può essere artificiale o solare. Il diametro di questi deve essere ristretto per evitare alle microalghe di ombreggiarsi a vicenda (Chisti, 2007). La miscelazione della coltura può avvenire attraverso insufflazione di aria o pompaggio. Come per i *flat plates* questo sistema permette alle cellule di subire un ridotto stress meccanico favorendo un miglior scambio dei gas con la coltura. Possono essere costruiti in forma elicoidale attorno ad una struttura cilindrica.

3. Fotobioreattori a colonna

I fotobioreattori a colonna sono strutture relativamente semplici: sono composti da una colonna verticale in vetro o plexiglas in cui la miscelazione è operata da un sistema di areazione che insuffla aria o una miscela di aria/CO₂ dal fondo (**Fig. 2c**). L'illuminazione avviene attraverso le pareti trasparenti o lampade a luce fredda interne. Possono contenere volumi dai 50 ai 200 L. Una variante di questa struttura sono i fotobioreattori anulari, che consistono in due cilindri, sempre di vetro, plexiglas o poliacrilato, di differenti diametri, posti l'uno dentro l'altro per formare una camera di coltura di larghezza variabile dai 5 cm ai 25 cm. Sono strutture a basso costo, semplici da utilizzare e consentono la crescita di una coltura monospecifica; offrono una miscelazione più efficiente garantendo un maggior tasso di trasferimento di volumi gassosi. E' consigliato l'utilizzo di questo metodo per ceppi dotati di cellule fragili o filamentose in quanto la miscelazione risulta essere più delicata rispetto ad altri fotobioreattori (*Nostoc* spp., *Microcystis* spp., *Nannochloropsis* spp.).



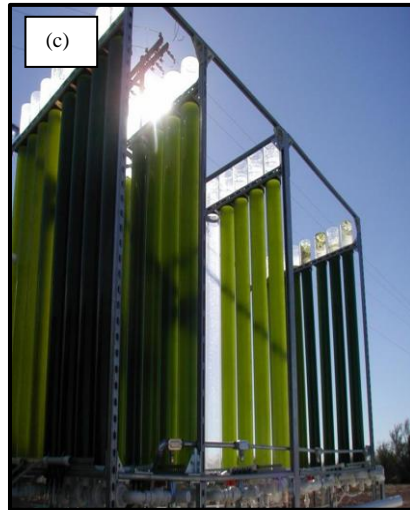


Fig. 2 Esempi di fotobioreattori chiusi per la coltivazione microalgale su larga scala. (a) e (c) Fotobioreattori piatti del tipo “flat plate” e fotobioreattori a colonna verticale a Phoenix (Arizona, U.S.A.); (b) Fotobioreattori tubolari nel Brasile meridionale.

Le problematiche relative all'utilizzo dei fotobioreattori interessano la manutenzione della struttura (come le escursioni termiche che richiedono sistemi di raffreddamento diversi, i materiali deteriorabili, la pulizia frequente a causa del biofouling) e gli effetti sulla coltura (eccessivo accumulo di ossigeno ed elevato stress indotto dal mescolamento). Questi svantaggi limitano le dimensioni dei fotobioreattori, che attualmente sono costituiti da volumi limitati. Gli elevati costi di mantenimento di questi tipi di coltura ne riducono l'utilizzo alle sole colture massive di elevata purezza, per l'estrazione di biomolecole di alto valore commerciale per cui è richiesta una condizione di sterilità, o per inoculi di colture in sistemi aperti; economicamente, ad oggi, non è quindi conveniente portarli a dimensioni industriali.

1.1.3 Comparazione tra sistemi aperti e sistemi chiusi

Considerando una stessa produzione di biomassa, ipotizzata uguale a 100 t/anno, in **Tabella 1** vengono comparati entrambi i sistemi. Dai risultati si osserva una notevole differenza in termini di prestazioni: i sistemi chiusi si caratterizzano per la maggiore produttività di biomassa ($48 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) rispetto ai $35 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ di un *open pond* (secondo quanto riportato da Chisti, 2007). I sistemi chiusi inoltre, permettono di raggiungere concentrazioni di biomassa superiori (fino a 4 g/L) rispetto ai sistemi aperti, facilitando la riduzione dei volumi in gioco. Per contro, i sistemi aperti consentono di ottenere una

biomassa che risulta dispersa in un volume elevatissimo (0,14 g/L); questi ultimi sono favoriti solo dai bassi costi che ne garantiscono l'economicità del processo.

Variabile	Unità	Fotobioreattori	Open Ponds
Produzione volumetrica	kg m ⁻³ d ⁻¹	1.535	0.117
Produzione areale	kg m ⁻² d ⁻¹	0.048	0.035
Concentrazione biomassa	kg m ⁻³	4.00	0.14
Velocità di diluizione	d ⁻¹	0.384	0.250
Area necessaria	m ²	5681	7828
Consumo di CO ₂	kg y ⁻¹	183333	183333
Produzione di biomassa	kg y ⁻¹	100000	100000
Produzione volumetrica	kg m ⁻³ d ⁻¹	1.535	0.117
Produzione areale	kg m ⁻² d ⁻¹	0.048	0.035
Concentrazione biomassa	kg m ⁻³	4.00	0.14
Velocità di diluizione	d ⁻¹	0.384	0.250

Tab.1 Confronto tra open ponds e fotobioreattori (Chisti Y., 2007).

1.2 Raccolta della biomassa algale

L'utilizzo dei composti derivabili dalle microalghe è solo l'ultima parte di un delicato processo di raccolta e trasformazione delle stesse. La separazione della biomassa algale dal mezzo acquoso infatti rappresenta un passaggio fondamentale, ma anche un limite nei processi di produzione in quanto proprio questa voce incide maggiormente sui costi di produzione. Di fatto è uno dei maggiori impedimenti alla diffusione delle colture microalgali su scala commerciale soprattutto a scopi energetici. La raccolta dipende soprattutto dalle caratteristiche della microalga considerata; per specie coloniali e filamentose come *Spirulina* la separazione dal mezzo acquoso attraverso filtrazione è più semplice rispetto a specie unicellulari e sferoidali come *Chlorella* spp. o *Nannochloropsis* spp. Nel corso del tempo sono state sviluppate diverse tecniche di recupero microalgale, alcune più semplici come la sedimentazione e altre più complesse ed onerose come la centrifugazione, la filtrazione e la flocculazione (Barbato, 2009). La sedimentazione è la tecnica di separazione più conveniente, che consiste nel semplice accumulo per gravità

della biomassa algale sul fondo di un contenitore di forme e dimensione adeguate a questo scopo. Il fattore critico relativo a questa tecnica è il tempo impiegato perché questa biomassa si accumuli sul fondo, dipendente da diversi fattori quali pH, temperatura e stato fisiologico della specie in oggetto. La centrifugazione può essere utilizzata per la maggior parte dei ceppi algali ad esclusione di quelli caratterizzati da cellule molto fragili, come *Dunaliella salina*. Il problema principale relativo all'uso di questa tecnica, è il costo sia degli strumenti sia dell'operatività. La centrifugazione può essere presa in considerazione in un passaggio di raccolta secondario, finalizzato alla concentrazione della biomassa in volumi acquosi limitati. La filtrazione è il metodo più utilizzato per raccogliere *Spirulina*, un cianobatterio filamentoso. Il processo risulta relativamente a basso costo in quanto prevede l'utilizzo di microfiltri. Tuttavia la filtrazione è limitata a solo microalghe filamentose o che siano in grado di formare colonie di dimensioni tali da essere tratteneute da filtri superiori a 20 μm (Molina Grima et al., 2003). La flocculazione chimica è ottenuta utilizzando polimeri (calce, allume, cloruro di ferro e/o polielettroliti) ed è il metodo più diffuso per la raccolta delle cellule microalgali in aggregati. Questo processo sfrutta la carica negativa delle pareti cellulari che viene neutralizzata dall'agente flocculante, consentendo la formazione di grandi fiocchi che sono poi recuperati per sedimentazione o per flottazione ad aria disciolta (Mata et al., 2010). Quest'ultima opzione è quella maggiormente utilizzata perché, anche se più onerosa rispetto ad altri metodi, produce una biomassa più concentrata. La raccolta con flocculanti chimici è impiegata solitamente in impianti di smaltimento delle acque reflue e in quelli di produzione commerciale di *Dunaliella salina*. Tuttavia tali processi, risultano essere ancora piuttosto costosi, sia per i flocculanti sia per l'operatività. Inoltre, il flocculante chimico può interferire nel trattamento della biomassa (permanenza della sostanza flocculante nella stessa), nella digestione anaerobica o nel riciclaggio dei nutrienti (Molina Grima et al., 2003). Altre metodiche di raccolta microalgale prevedono la distruzione meccanica delle cellule (le specie con parete cellulare più resistente) utilizzando omogenizzatori, sonicatori e metodi chimici. Ottenuta la biomassa umida è possibile procedere alla disidratazione cellulare (spray drying) raggiunta attraverso l'uso di essiccatori e liofilizzatori. Questo metodo ha il vantaggio di non surriscaldare eccessivamente la biomassa, evitando il danneggiamento di composti termolabili come alcune vitamine. Una volta acquisita la biomassa essiccata si può procedere all'estrazione dei composti di interesse.

1.3 Applicazioni commerciali della biomassa microalgale

Le microalghe si sono adattate ad una vasta gamma di habitat naturali, spesso anche estremi. Questo ha portato allo sviluppo di numerosi sistemi di protezione contro i vari fattori di stress rappresentati da eccessiva irradianza, salinità, temperatura, deficit nutrizionali. Questi sistemi di protezione includono la produzione di sostanze di varia natura come acidi grassi polinsaturi, antiossidanti, composti citostatici. Pertanto, la biomassa microalgale è coltivata commercialmente come fonte di cibo, ma anche per ottenere questi composti.

1.3.1 Nutraceutica e mangimistica

La biomassa microalgale è utilizzata come supplemento nutrizionale, in quanto dotata di un'ampia gamma di importanti composti (vitamine, minerali, carotenoidi, proteine, carboidrati, lipidi, fibra grezza) che trovano applicazione nel settore nutraceutico, della cosmesi e nell'industria alimentare e mangimistica. La microalga verde *Chlorella* spp. e la cianoficea *Spirulina* sono commercializzate come fonte proteica alternativa sotto forma di compresse, capsule, e liquidi, il cui mercato annuale corrisponde a migliaia di tonnellate. *Dunaliella salina* è coltivata come importante fonte naturale di β -carotene, pigmento colorato dalle proprietà antiossidanti, utilizzato come integratore, colorante e additivo alimentare umano e animale. L'elevato contenuto di astaxantina (xantofilla con un potere antiossidante superiore di 550 volte la Vitamina E (Heydarizadeh et al., 2013)) derivante dalla coltivazione massiva di *Haematococcus pluvialis* è sfruttato nel campo alimentare, nutraceutico e in acquacoltura: non porta solo alla tipica colorazione rosa negli allevamenti di salmonidi e crostacei, ma anche al potenziamento del sistema immunitario degli stessi. La biomassa microalgale è una fonte proteica alternativa commercialmente rilevante, in quanto sia l'uomo sia l'animale non sono in grado di sintetizzare da sé gli amminoacidi essenziali, presenti abbondantemente invece nelle cellule vegetali (Becker, 2004). E' altresì un'importante fonte di lipidi utilizzati come integratori con lo scopo di ridurre patologie cardiovascolari (ipertensione, ipercolesterolemia) e rafforzare il sistema immunitario. Inoltre i PUFA'S (acidi grassi polinsaturi come l'acido linolenico, acido arachidonico, acido eicoesapentaenoico e acido docosaesaenoico) sono utilizzati non solo come supplementi nutrizionali, ma anche come importanti additivi nel latte artificiale per l'infanzia.

1.4 Microalghe ed energia

Una delle maggiori problematiche ambientali odierne, interessanti l'intero pianeta, è la produzione dei gas serra, derivanti dalle attività antropiche. Definiti come *“gas presenti in atmosfera, di origine naturale o antropica, trasparenti alla radiazione solare in entrata sulla Terra ma capaci di trattenere, in maniera consistente, la radiazione infrarossa emessa dalla superficie terrestre, dall'atmosfera e dalle nuvole”* dall' IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change (<http://www.ipcc.ch/>)), sono la causa principale del riscaldamento globale. Dall'inizio della rivoluzione industriale, l'utilizzo di combustibili fossili derivante dalle attività antropiche ha contribuito all'aumento della concentrazione dell'anidride carbonica in atmosfera da 280 ppm a 390 ppm, dati resi noti dall'ESRL (Earth System Research Laboratory) (<http://www.esrl.noaa.gov/>). Il maggior quantitativo di queste emissioni gassose deriva dalla combustione di combustibili fossili generato dall'agricoltura, dai trasporti, ma soprattutto dalle industrie di fornitura e utilizzo dell'energia. La crescita di nuovi paesi emergenti come India, Cina e Brasile inoltre, aggrava questa problematica, portando quindi la popolazione mondiale ad avere sempre più *“fame”* di energia. Oltre ad interventi normativi, come l'attuazione di trattati internazionali (Protocollo di Kyoto 1997) sottoscritti dai governi di 180 Paesi, scienziati e ricercatori di tutto il mondo, sono impegnati nella difficoltosa ricerca di una soluzione che sia in grado di risolvere concretamente questo problema. Tra queste, di primaria importanza, è l'individuazione di possibili altre fonti di energia rinnovabile e pulita. In questo modo si consentirebbe anche di diminuire il problema della riduzione delle riserve di petrolio, le crescenti difficoltà nella sua estrazione e trasformazione e l'aumento del costo dello stesso. Ad oggi sono state studiate e implementate diverse opzioni con più o meno successo come l'energia solare (termica e fotovoltaica), l'energia idroelettrica, l'energia geotermica, l'energia eolica (Gilbert e Perl, 2008). L'alternativa più promettente per la sostituzione dei combustibili fossili come fonte energetica è l'utilizzo di biomasse di origine vegetale da cui è possibile ottenere biocarburanti.

1.4.1 Biocarburanti

La Direttiva Europea 2009/28/CE definisce il concetto di biomassa come *“la frazione biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali), dalla silvicoltura e dalle*

industrie connesse, comprese la pesca e l'acquacoltura, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani". Per biomassa si intende quindi un insieme di composti di origine organica e naturale che può essere utilizzata per produrre energia. Il tempo di sfruttamento del composto risulta pari a quello di rigenerazione, ragion per cui le biomasse sono classificate come fonti energetiche rinnovabili. L'utilizzo di combustibili di origine vegetale rispetto ai combustibili fossili tende ad un bilancio neutro della CO₂: durante il suo accrescimento infatti, la biomassa fotosintetica assorbe la stessa quantità di CO₂ emessa quando alla fine viene combusta. L'utilizzo delle biomasse vegetali a fini energetici quindi, non apporterebbe ulteriore contributo al rilascio di anidride carbonica, escludendo le emissioni dovute ai processi di trasformazione, raccolta e trasporto di quest'ultime, influenzando negativamente sul bilancio totale. Per biocombustibile si intende un carburante liquido o gassoso ottenuto in modo indiretto da biomasse vegetali. Attraverso un processo di fermentazione alcolica è possibile ottenere da piante edibili (ricche di zuccheri) come mais, barbabietola e canna da zucchero, il bioetanolo, che può essere utilizzato come carburante per motori a combustione interna in sostituzione della benzina. Da biomasse di origine oleaginosa, come la soia, il girasole e la colza, attraverso un processo di spremitura e trans-esterificazione è possibile ottenere il biodiesel, utilizzato in sostituzione e in associazione al gasolio per il riscaldamento e l'alimentazione dei motori ad accensione spontanea (motori Diesel). Esistono altre tipologie di biocombustibili, quali il biometanolo, il biodimetil etero, gli idrocarburi sintetici, il bioidrogeno. La produzione di questi biocarburanti, definiti di prima generazione, ha però delle limitazioni: il mercato richiede una quantità di materia prima largamente superiore a quella disponibile. Infatti, secondo la RFA (*Renewable Fuel Agency*, 2008), le piantagioni intensive e l'aumento delle terre coltivate porta ad una competizione per i terreni destinati all'agricoltura (favorendo un'ulteriore diminuzione delle risorse alimentari, gravissimo problema che colpisce buona parte della popolazione mondiale), perdita di biodiversità, dovuta all'aumento della deforestazione e allo sfruttamento di aree di importanza ecologica, elevato consumo di acqua ed utilizzo di fertilizzanti e pesticidi utilizzati per queste colture e l'aumento dei prezzi dei prodotti agricoli dovuti anche alla corsa dei biocarburanti. Problematiche che assumono maggiore gravità se si considera che le coltivazioni dedicate alla produzione di questi biocarburanti, di proprietà di multinazionali occidentali, sono principalmente in Africa e in Asia, ove la carenza alimentare è una piaga

quasi irreversibile (www.rivistamissioniconsolata.it). Inoltre la concorrenza per l'utilizzo dell'olio vegetale rappresenta una delle cause principali del costo elevato del biodiesel. Una delle soluzioni per ridurre questo costo sarebbe sfruttare maggiormente materie prime di basso costo come olio non edibile, olio per friggere esausto, lubrificanti e grassi. Il principale problema è che il quantitativo disponibile di tali materiali risulta essere insufficiente per soddisfare l'enorme richiesta di biodiesel. Da non sottovalutare inoltre che le biomasse vegetali non contengono molta energia; queste arrivano a coprire solo il 25% di quello che si otterrebbe dallo stesso volume di carbone (Ricci, 2010). Nei paesi industrializzati, i costi della produzione di energia elettrica derivante da biomasse variano fra i 18 e i 28 centesimi di euro per kilowattora, ancora piuttosto distanti dai costi dei combustibili fossili (www.biomassenergycentre.org). La necessità di superare queste problematiche ha portato alla nascita di una seconda generazione di biocarburanti, il cui obiettivo è di utilizzare materie prime caratterizzate da una maggiore resa per ettaro riducendo le terre coltivate e garantendo lo stesso livello di performance dei combustibili esistenti. I composti utilizzati sono ricavati non dai frutti, ma dai fusti delle piante, dagli scarti vegetali e dall'erba dei terreni incolti. La produzione di carburanti di seconda generazione sfrutta la conversione di materiale lignocellulosico di scarto in bioetanolo (attraverso processi di idrolisi e fermentazione) o, come per l'arbusto *Jatropha curcas* in biodiesel (Barnwal and Sharma, 2005) (attraverso gassificazione o pirolisi). Tuttavia, la tecnologia per convertire la biomassa totale non ha ancora raggiunto il livello necessario per uno sfruttamento commerciale (Brennan e Owende, 2010). Nonostante i vantaggi legati all'utilizzo di biocarburanti (abbattimento CO₂, riduzione dell'emissione di sostanze inquinanti, diminuzione della pressione della scarsità di petrolio), allo stato attuale non ci sono ancora le condizioni per la sostituzione definitiva e completa del petrolio.

1.4.2 Biodiesel da microalghe

In una prospettiva temporale di medio-lungo periodo, in diversi Paesi sono state attivate nuove linee di ricerca finalizzate a sviluppare e mettere a punto nuove tecnologie eco-compatibili per la produzione di energia rinnovabile e pulita. Queste tecnologie prevedono l'impiego dei cosiddetti carburanti di terza generazione derivanti dall'utilizzo della biomassa algale. La sua coltivazione non interferisce con le produzioni agricole dedicate all'alimentazione umana e può essere coltivata in aree altrimenti non utilizzabili; per la

crescita, si potrebbero sfruttare acque eutrofiche come i reflui di origine industriale e agricola ricche di nutrienti, favorendo anche una possibile depurazione (Samorì et al., 2013). L'ambizione dei ricercatori è quella di poter sfruttare la capacità microalgale di accumulare lipidi per estrarne olio da convertire in biodiesel. Le microalghe sarebbero capaci di produrre 30 volte l'equivalente in olio rispetto alla stessa area coltivata con specie terrestri convenzionali (Barbato, 2011) e nella **Tabella 2** è possibile osservare questo confronto (la coltivazione della biomassa microalgale è stata ottenuta sperimentalmente in fotobioreattori). Da questa tabella è plausibile supporre che le stesse, siano l'unica fonte di biodiesel che sia in grado di sostituire completamente i combustibili fossili. Il contenuto di olio nelle microalghe è nettamente più elevato rispetto alle piante oleaginose, in quanto può superare anche l'80% della biomassa secca (Spolaore et al., 2006). Come mostrato in **Tabella 3**, il contenuto medio di olio per cellula algale si aggira intorno al 50%. Questo contenuto dipende dal tasso di crescita, dal contenuto in biomassa e dalla specie. A seconda delle specie, le microalghe producono molti tipi diversi di lipidi, idrocarburi e altri oli complessi (Guschina e Harwood, 2006) e non tutti questi composti sono adatti per la produzione di biodiesel. Esistono però ancora diversi punti critici nella realizzazione di produzioni commerciali di microalghe da impiegare nel settore energetico. La tecnologia è ancora in una fase embrionale; lo sviluppo ed il perfezionamento dei processi tecnologici necessita di investimenti consistenti in ricerca e sviluppo e di strategie politiche corrette per regolare e supportare tutte le fasi della produzione, dalla coltivazione delle materia prime, alla fase di raccolta della biomassa, che incide per il 20-30% sul costo totale di produzione delle microalghe (Chisti Y. 2007, Demirbas A., 2011), alla distribuzione e al consumo finale. Economicamente infatti, la produzione di biodiesel da microalghe non è ancora competitiva con i carburanti tradizionali. Si stima che in media la produzione di 1 kg di microalghe abbia un costo di circa 2,95 \$ o 3,80 \$, a seconda che si utilizzino i fotobioreattori o vasche raceway e assumendo che la CO₂ sia disponibile a costo zero (De Marco et al. 2006). Le previsioni del prossimo futuro suggeriscono che, grazie alle economie di scala, una produzione annua di 10.000 t di microalghe sia in grado di ridurre il costo di produzione tra 0,47 \$/kg e 0,60 \$/kg.

Materia prima	Contenuto lipidico (% olio/s.s.)	Rendimento in olio (L olio/ha)	Suolo utilizzato (m ² /kg biodiesel)	Resa in biodiesel (kg biodiesel/ha)
Mais	4	172	66	152
Soia	18	446-636	18	562
Jatropha	28	741-1.892	15	656
Camelina	42	915	12	809
Colza	41	974	12	946
Girasole	40	1.070	11	1.156
Olio di palma	36	5.366-5.950	2	4.747
Microalghe (basso contenuto in olio)	30	58.700	0,2	51.927
Microalghe (medio contenuto in olio)	50	97.800	0,1	86.515
Microalghe (elevato contenuto in olio)	70	136.900	0,1	121.104

Tab. 2 Confronto in termini di resa lipidica tra colture oleaginose tradizionali e biomassa microalgale (elaborazione propria dati: Chisti Y., 2007; Demirbas, A, Demirbas, M.F., 2011; Lagioia, G. et al., 2011; Mata, T.M. et al., 2010).

Microalga	Contenuto lipidico (% s.s.)	Microalga	Contenuto lipidico (% s.s.)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24-31	<i>Nitzschia sp.</i>	16-47
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Pavlova lutheri</i>	35
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	16-40	<i>Pavlova salina</i>	31
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18-57
<i>Chlorella</i>	18-57	<i>Prymnesium parvum</i>	22-38
<i>Dunaliella sp.</i>	17-67	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16-40
<i>Ellipsoidion</i>	27	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-55
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33	<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Monallanthus salina</i>	22	<i>Skeletonema</i>	13-51
<i>Nannochloris sp.</i>	20-56	<i>Spirulina</i>	4-9
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12-68	<i>Stichococcus</i>	33
<i>Neochloris oleabundans</i>	29-65	<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Tab. 3 Contenuto lipidico per diverse microalghe (elaborazione propria dati Ahmad, A.L. 2011; Bruton, T. et al. 2009; Chisti, Y., 2007; Demirbas, A, Demirbas, M.F., 2011; Mata T.M. et al., 2010; Singh, J., Gu S., 2010).

1.4.3 Biorisanamento e bioraffinerie

Le microalghe sono impiegate anche nel trattamento delle acque reflue in cui svolgono l'importante funzione di diminuire la richiesta biochimica dell'ossigeno (BOD) (Samorì et al., 2013). Nitrati, fosfati, nonché importanti gas residuali industriali e agricoli (ammonio e anidride carbonica), incidono gravemente sul problema dell'eutrofizzazione delle acque. Le microalghe assorbono l'eccesso di nutrienti e di anidride carbonica presenti nei reflui portando ad un aumento di produzione di biomassa, rilasciando ossigeno attraverso il processo fotosintetico. Inoltre è stata dimostrata la capacità di queste di assorbire composti metallici dagli scarichi industriali; *Ascophyllum nodosum* è in grado di rimuovere dal mezzo acquoso metalli quali cadmio, nickel e zinco (Romera et al., 2008) e *Scenedesmus obliquus* ha la capacità di degradare il 90 % del cianuro presente nell'ambiente (Gurbuz, 2009). Il consumo e la conversione di queste sostanze da parte degli organismi fotosintetici può essere utilizzato per la riduzione dei carichi ambientali. Dato che le microalghe devono essere smaltite come scarti industriali, le stesse possono essere utilizzate come fertilizzanti e ammendanti. La coltivazione di microalghe legata alla produzione di biodiesel, quindi, è una tecnologia che potrebbe avere un elevato potenziale di sviluppo, consentendo una netta riduzione delle emissioni di CO₂ rispetto all'utilizzo di combustibili fossili, grazie alla capacità di queste di assimilare CO₂ nella loro biomassa (Brown e Zeiler, 1993) e senza sottrarre risorse alle coltivazioni terrestri per scopi alimentari. Inoltre, dopo l'estrazione di biocombustibile, la biomassa microalgale residua potrebbe ancora essere impiegata per l'estrazione di biomolecole di interesse commerciale (Chisti, 2008) e per la produzione di altri biocarburanti come il biogas. Un fattore che potrebbe contribuire a rendere i costi del biodiesel da microalghe più competitivi è lo sviluppo di bioraffinerie. Una bioraffineria può produrre contemporaneamente, dalla stessa biomassa microalgale, più composti, che collocati su mercati diversi, costituiscono altre fonti di reddito. La valorizzazione di questi co-prodotti e l'applicazione contemporanea e non singola, come invece accade oggi, delle tecnologie di conversione della biomassa algale quindi, consentirebbe di ridurre notevolmente il costo di produzione del biodiesel. Si prevede che nel 2015 i prodotti ricavati dalle microalghe potrebbero avere un mercato potenziale a livello mondiale dell'ordine di 25-50 miliardi di \$, dominato dalla produzione di biodiesel (50%), e dalla produzione di integratori alimentari (Alabi et al. 2009).

1.5 Conversione della biomassa algale

I biocombustibili sono ottenuti dalla conversione della biomassa microalgale. Queste procedure si basano su processi biologici, come le fermentazioni per produrre metano o etanolo, o su processi chimici, come la gassificazione e la pirolisi, per la produzione di oli e idrocarburi utilizzabili nella conversione in biodiesel. “Il biogas è una miscela gassosa composta prevalentemente da metano e anidride carbonica in rapporti che oscillano dal 50:50 al 80:20 $\text{CH}_4:\text{CO}_2$. All'interno di questa miscela sono presenti in quantità minori anche altri gas quali l'idrogeno solforato, l'ammoniaca, l'idrogeno, l'ossido di carbonio” (http://www.enea.it/produzione_scientifica/pdfvolumi/V2010_07_-FontiRinnovabili.pdf).

Il biogas è ottenuto non solo da vegetali coltivati, ma anche da rifiuti vegetali e liquami di origine animale (ragion per cui questo processo è in relazione con il trattamento delle acque reflue), attraverso un processo di degradazione della sostanza organica in condizioni di anaerobiosi (in assenza di ossigeno), chiamato digestione anaerobica. La biomassa è inserita all'interno di un digestore anaerobico di grandi dimensioni (solitamente in acciaio o cemento) in cui si sviluppano microorganismi, che attraverso fermentazione anaerobica dei fanghi di acque reflue, primari (acque di scarico sedimentate) e secondari (fanghi attivi sedimentati) producono biogas. Questo successivamente subisce un trattamento di depurazione che gli consente di essere utilizzato come carburante e combustibile per la produzione di energia termica ed elettrica. E' una tecnologia ampiamente praticata e consolidata ed è anche un mezzo potenzialmente a basso costo per ottenere rendimenti elevati per recuperare energia. Genericamente le microalghe non contengono elevate quantità di carboidrati, presenti sotto forma di amido nelle alghe verdi e di glicogeno nei cianobatteri. Affinché la produzione di bioetanolo sia effettuabile attraverso un processo di fermentazione alcolica, è necessaria una biomassa algale con un alto contenuto in carboidrati fermentabili superiore al 60% del peso secco. L'accumulo elevato di zuccheri si osserva solo in condizioni di limitazione di azoto, in cui la crescita cellulare è ridotta e una cospicua parte della CO_2 fissata fotosinteticamente è immagazzinata sotto forma di riserve (Aoyama et al., 1987). La gassificazione è un processo che consiste nell'ossidazione incompleta di un determinato substrato (biomassa, idrocarburi) ad elevata temperatura (900-1000 °C) per la produzione di gas di sintesi (*syngas*, una miscela di CO , CH_4 , H_2 , CO_2). In questo modo la biomassa è direttamente convertita in metano senza essere essiccata e l'azoto presente viene trasformato in ammoniaca. La pirolisi è un processo di

decomposizione termochimica, che converte la biomassa, precedentemente essiccata, in biocarburante liquido, composto da residui carboniosi (*biochar*, che ha mercato come fertilizzante per terreni) e gas. Questo metodo prevede l'applicazione di calore, a temperature comprese tra 400 e 800 °C, in completa assenza di un agente ossidante, oppure con una ridottissima quantità di ossigeno (in quest'ultimo caso il processo può essere descritto come una parziale gassificazione). Nel processo di liquefazione la biomassa liquida può anche essere convertita direttamente in carburante liquido previa liquefazione con acqua in condizioni supercritiche. Per finire è possibile bruciare direttamente la biomassa in presenza di aria (combustione) convertendola in gas ad elevata temperatura che possono essere usati per produrre energia elettrica.

2.1 Biochimica e fisiologia delle microalghe

2.1.1 Fasi di crescita microalgale

La crescita delle microalghe avviene generalmente in 4 fasi, rappresentate in Figura 3:

1. La fase Lag è la fase di adattamento della coltura (durata media di 1-2 giorni).
2. La fase esponenziale è la fase di attiva divisione delle cellule: la densità cellulare aumenta in funzione del tempo ed è dipendente da parametri ambientali presenti nel mezzo di coltura: nutrienti, temperatura ed intensità luminosa.
3. Nella fase stazionaria si ha un rallentamento della divisione cellulare e la densità della popolazione permane relativamente costante.
4. Alla fase di declino corrisponde la sospensione della divisione cellulare e dell'attività metabolica. Le cellule iniziano a morire e la densità cellulare decresce rapidamente. Questa fase coincide con l'esaurimento dei nutrienti o l'instaurarsi di condizioni avverse alla crescita nel mezzo di coltura.

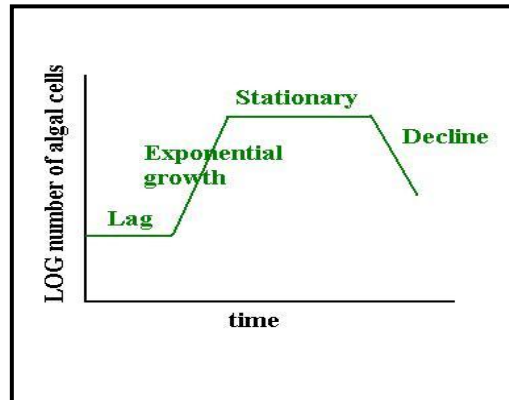


Fig.3 Curva di crescita tipica di una popolazione fitoplanctonica.

E' possibile inoltre calcolare:

- il tasso di crescita di una popolazione fitoplanctonica rappresentato dalla seguente equazione:

$$\mu = \ln (N_2 - N_1) / [t_2 - t_1]$$

dove N_1 e N_2 rappresentano la densità di popolazione al tempo t_1 e t_2

- tempo di divisione cellulare (**tg**) descritto dalla seguente equazione (Guillard, 1973):

$$\mathbf{tg = 0.6931/\mu}$$

2.2 Biochimica dei lipidi

E' noto che le microalghe contengano elevate quantità di lipidi e l'interesse nei loro confronti come possibile fonte di biocarburanti ha permesso un implementazione della ricerca sui meccanismi di produzione di lipidi algali e i loro metabolismi. I lipidi presenti nelle cellule microalgali possono essere divisi in due grandi classi in base alle loro caratteristiche chimiche: i lipidi neutri (mono-, di-, tri-gliceridi, cere, steroli, carotenoidi e idrocarburi) e i lipidi polari (glicolipidi, fosfolipidi, sulfolipidi). La loro composizione relativa nelle microalghe dipende dalla specie utilizzata, dalle condizioni ambientali e dalla disponibilità di nutrienti in cui le cellule sono coltivate (Hu et al., 2008; Roessler, 1990). Le microalghe verdi sono in grado di fissare l'anidride carbonica in zuccheri utilizzando l'energia solare. Gli zuccheri prodotti possono essere metabolizzati, in base alle necessità, in acetil-Coenzima A, che funge da precursore per la sintesi di acidi grassi nei cloroplasti. Gli acidi grassi più usualmente sintetizzati sono a 16 o 18 atomi di carbonio e possono essere saturi e insaturi, in base all'assenza o presenza di doppi legami all'interno della catena carboniosa. Quest'ultimi possono avere più doppi legami e sono chiamati acidi grassi polinsaturi (PUFA'S). La prima reazione di questo meccanismo è catalizzata dall'enzima acetil-CoA carbossilasi che combina acetil-CoA e CO₂ in malonil-CoA. Questo composto risulterà essere il donatore principale di carbonio per tutte le successive reazioni di allungamento che andranno a formare gli acidi grassi, utilizzando ATP e NADPH prodotto durante la fotosintesi. Il processo fotosintetico, come precedentemente menzionato, è quindi essenziale non solo per essere una fonte di carbonio, ma anche nel generare potere riducente (NADH e NADPH) ed energia necessaria (ATP) per la sintesi di acidi grassi. Questi ultimi, formati nel cloroplasto, vengono trasportati nel citosol a formare un gruppo di molecole che, nel reticolo endoplasmatico, possono essere ulteriormente allungate, insaturate o assemblate nei diversi lipidi (trigliceridi, galattolipidi, fosfolipidi etc.) da destinare alle diverse funzioni cellulari (**Fig. 4**). Recentemente inoltre è stato dimostrato che almeno una parte del percorso di biosintesi dei triacilgliceroli è anche presente nel plastidi di *Chlamydomonas reinhardtii* (Fan et al., 2011). Raggiunto il

quantitativo appropriato di triacilgliceroli, questi fuoriescono per gemmazione dal reticolo endoplasmatico formando corpuscoli cellulari distinti, anche definiti gocce lipidiche o oleosomi. A causa della loro natura idrofoba questi oli non sono in grado di persistere e diffondere all'interno del citoplasma; la loro dispersione è facilitata dal fatto che siano racchiusi da una membrana a singolo strato fosfolipidica a cui sono associate proteine strutturali e metaboliche (Moellering e Benning, 2010). La produzione di lipidi è legata allo stato fisiologico delle cellule e dalle potenziali condizioni di stress. Normalmente non vi è una elevata produzione lipidica durante la crescita, ma quando sono sottoposte a forti condizioni di stress quali carenza o assenza di nutrienti (in principal modo azoto) od elevate concentrazioni di anidride carbonica, questa produzione aumenta notevolmente, soprattutto per quanto riguarda l'accumulo di trigliceridi (Rodolfi et al., 2008; Roessler, 1990).

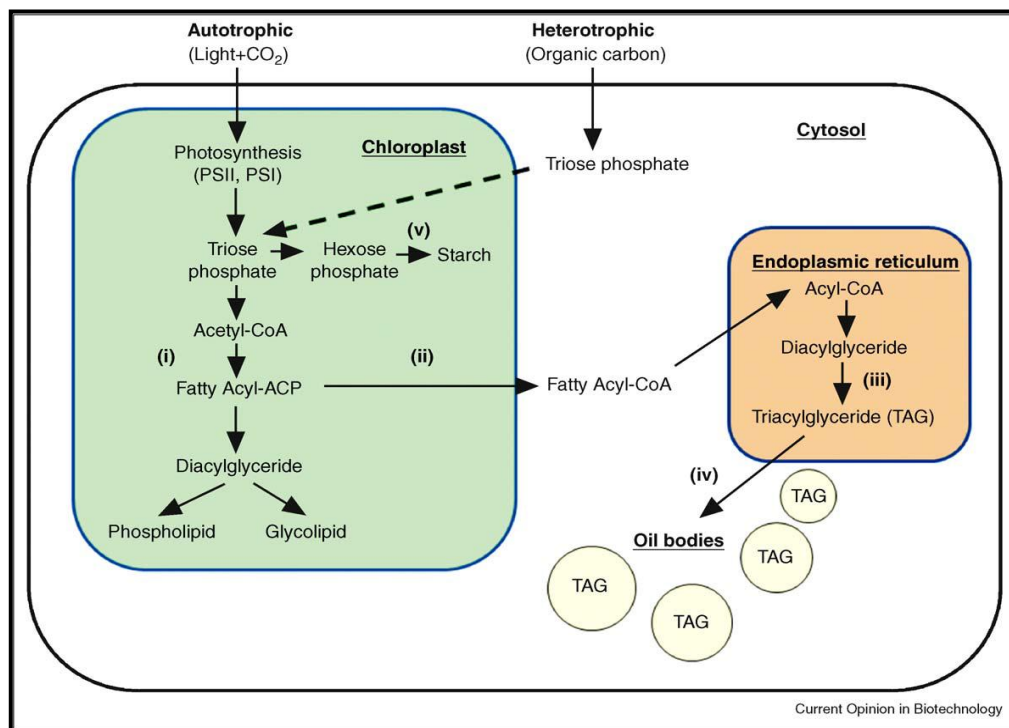


Fig. 4 Panoramica generale del percorso di cattura del carbonio e biosintesi dei lipidi. Fonte: Hu et al., 2008.

2.2.1 Composizione chimica del Biodiesel

Perché possa essere utilizzato come biocarburante, l'olio microalgale deve essere estratto in forma pura. E' necessaria quindi una separazione dei lipidi dagli altri composti all'interno della cellula. Ad oggi sono già presenti sistemi di depurazione ed estrazione di

oli da biomassa vegetale e queste tecniche possono essere adattate anche per l'olio algale. Come discusso nel paragrafo precedente, gli oli microalgali sono principalmente composti da trigliceridi costituiti a loro volta, da acidi grassi esterificati al glicerolo. Le catene di acidi grassi sono molto simili chimicamente agli idrocarburi presenti nel gasolio. Tuttavia la presenza di questi acidi grassi conferisce maggior viscosità rispetto al diesel convenzionale, di conseguenza l'olio estratto dalle cellule algali non può essere utilizzato direttamente come biocarburante. E' richiesto quindi un ulteriore processo chiamato transesterificazione che avviene in presenza di metanolo per produrre i corrispondenti esteri metilici degli acidi grassi. La miscela derivante è il reale biodiesel, che possiede proprietà di combustione e viscosità simili al diesel ricavato dal petrolio e può sostituirlo nella maggior parte dei suoi impieghi. Come sottoprodotti e sostanze residue si formano glicerolo e acqua di produzione; attraverso depurazione è comunque commercializzabile il primo e nuovamente utilizzabile la seconda. Le proprietà chimico-fisiche del biodiesel sono determinate dalla struttura degli acidi grassi che lo costituiscono. Gli acidi grassi saturi producono un biodiesel con una maggiore stabilità ossidativa, con un più alto numero di cetani e con un aspetto gelatinoso a temperatura ambiente. Quello prodotto da biomasse ricche di PUFA'S (acidi grassi poli-insaturi), invece, possiede buone proprietà di scorrimento a freddo, ma è caratterizzato da una maggiore sensibilità all'ossidazione e grandi problemi di instabilità nei periodi prolungati di conservazione (Chisti, 2007; Hu et al., 2008). Gli idrocarburi presenti nelle cellule microalgali sono lipidi neutri simili a quelli del petrolio, ma generalmente, sono presenti in una quantità inferiore al 5% in peso secco, ad eccezione fatta di *Botryococcus braunii* che ne produce fino all'86% della sua biomassa (Yoshida et al., 2012). Grazie alla capacità di fissare l'anidride carbonica ed utilizzare meccanismi di concentrazione della stessa all'interno della cellula (Giordano et al., 2005), è stato dimostrato come per questa microalga verde, l'aumento dei livelli di CO₂ sia favorevole ad una maggior produzione lipidica (Baba & Shiraiwa, 2012). Per una produzione industriale, una delle problematiche più evidenti da risolvere è quella di aumentare la resa lipidica microalgale, che attualmente è ancora contenuta. Ciò è dovuto al fatto che la maggior parte delle specie algali inizino ad accumulare notevoli quantità di lipidi (anche fino al 70% in peso secco) solo quando sono sottoposte a condizioni stressanti, di cui quella più efficace è la rimozione da azoto (Hu et al., 2008). La deplezione di questo nutriente limita tuttavia, la quantità di biomassa e quindi la

produttività lipidica globale. I rendimenti lipidici ottenuti fino ad oggi, sono di circa venti volte inferiori rispetto alle aspettative teoriche (Sheehan et al., 1998).

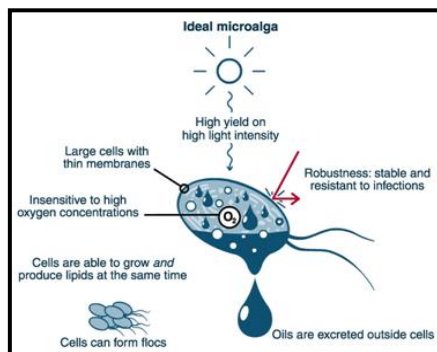


Fig.5 Caratteristiche fisiologiche della microalga ideale per la produzione di biodiesel. Fonte: Wijffels and Barbosa, 2010.

L'organismo ideale (**Fig. 5**) quindi, dovrebbe avere un'elevata velocità di crescita che a sua volta dovrebbe portare ad una resa elevata in biomassa anche ad alte intensità luminose, ma nel contempo possedere anche un'elevata concentrazione di lipidi che siano adatti allo scopo. Inoltre dovrebbe possedere altre caratteristiche quali:

- Facilità di raccolta e di estrazione
- Membrane sottili che rivestano grosse cellule in modo che i corpuscoli oleosi siano direttamente escreti dalla cellula
- Resistenza alle infezioni e all'eccesso di ossigeno.

Ad oggi, la specie con maggior produzione lipidica è la microalga verde *Botryococcus braunii*, con un contenuto lipidico tra il 25% e il 86% del suo peso secco quando sottoposta a stress o in condizioni di crescita non favorevoli (Metzger e Largeau , 2005). L'elevata produzione lipidica ha lo svantaggio di provocare un consistente rallentamento della crescita (anche 20 giorni per la duplicazione cellulare). Un'altra microalga verde potenzialmente utilizzabile per la produzione di biodiesel, le cui ricerche assumono sempre più importanza, è *Scenedesmus obliquus* (Urrutia et al., 1995) che ha maggior resistenza e velocità di crescita rispetto a *Botryococcus braunii* a discapito però del contenuto lipidico che è nettamente inferiore (29,5% - 43% dati sperimentali) (Mandal e Mallick, 2009).

2.3 Nutrienti

Per la produzione di materia organica e per la crescita, sono richiesti diversi elementi essenziali per tutto il fitoplancton: C, H, O, N, P, S, K, Mg, Na e Cl necessari ad elevate concentrazioni in quanto svolgono ruoli strutturali ed osmotici. Altri sono richiesti solo per la crescita di determinate specie, come il Silicio per le diatomee o il Calcio per i cocolitoforidi. Oltre a questi macronutrienti, gli organismi fototrofi necessitano di Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Ca e Mo e di alcune vitamine essenziali. Tra tutti questi nutrienti solamente C, N e P (e Si per le diatomee) possono diventare limitanti, influenzando negativamente la produzione di biomassa microalgale. Ogni organismo autotrofo utilizza le risorse in maniera differente, ma ciò che rimane costante è il rapporto (**Rapporto di Redfield**) che queste hanno tra loro: C:N:P=106:16:1 (Redfield, 1958). Questo rapporto è espresso in moli e può essere anche esteso al Silicio per le diatomee (C:N:P:Si=106:16:1:16) ed al Ferro (C:N:P:Fe=106:16:1:0.1-0.001) (Broecker and Peng, 1982). A tali condizioni nessun nutriente è limitante. Per individuare l'elemento limitante in ambiente acquatico è necessario esaminare il rapporto N:P: se questo dovesse essere superiore a 16 si può affermare che il nutriente limitante la crescita dei fototrofi sia il fosforo e l'azoto in eccesso presente nel mezzo acquoso non può essere utilizzato. Viceversa, un rapporto inferiore a 16 indica che il nutriente limitante sia l'azoto. Il concetto di nutriente limitante è stato proposto da Justus von Liebig nel 1840: egli mise in evidenza il fatto che sia solo un nutriente a limitare la crescita di un organismo fotosintetico ed in particolare quell'elemento che è presente in minore quantità nell'ambiente rispetto alle necessità dell'organismo stesso. Questo fattore è chiamato *nutriente limitante* perché di fatto è in grado di determinare il limite massimo di crescita degli organismi fotosintetici. La **legge di Liebig** è universalmente riconosciuta in campo ecologico anche come "Teoria del Minimo". L'azoto cellulare lo si ritrova in composti quali pigmenti, ormoni, acidi nucleici ed è necessario ad elevate quantità. E' solitamente assorbito come azoto ammoniacale o nitrati; i nitrati attraversano la membrana cellulare per trasporto attivo primario e, o sono immagazzinati all'interno della cellula o convertiti prima in nitriti (mediante l'enzima nitrato reduttasi) e successivamente in ammoniaca (mediante l'enzima nitrito reduttasi). Questo processo non richiede dispendio energetico da parte della cellula. Come fonte di azoto, l'azoto ammoniacale è preferito rispetto al nitrato in quanto più biodisponibile e direttamente utilizzabile da parte della cellula: per contro

un'elevata concentrazione di questa molecola risulta essere molto tossica ed è per questo che le cellule vegetali incorporano questo composto in glutammina grazie all'enzima glutammina sintetasi. Il fosforo è presente all'interno di composti ad elevata energia come ATP, fosfolipidi, acidi nucleici ed è anche esso necessario in elevate quantità. E' acquisito principalmente come ione ortofosfato, polifosfati e composti organo-fosforici. Sulla membrana plasmatica delle cellule vegetali sono presenti fosfoesterasi che scindono i legami estere dei gruppi fosfato legati a composti organici. All'interno della cellula il fosforo inorganico è immagazzinato come polimero (polifosfati) all'interno dei vacuoli o nel citoplasma sottoforma di granuli. Per necessità questi composti possono essere velocemente idrolizzabili in modo da ottenere fosforo immediatamente disponibile (Mitsubishi et al., 2005).

2.4 Identificazione di *Desmodesmus communis*

Desmodesmus communis (**Fig. 6**) è una microalga verde, ubiquitaria di acque dolci, appartenente alla classe delle *Chlorophyceae* (*Sphaeropleales*, *Scenedesmaceae*) e si presenta in colonie piatte disposte linearmente, composte da 2 a 4 fino ad 8 cellule ellissoidali od ovoidali con apice arrotondato; le due cellule terminali si differenziano da quelle interne per la forma e per la presenza o l'assenza di due lunghe spine caudate o arcuate nelle zone angolari e per la presenza di ciuffi o setole, che conferiscono galleggiabilità alla colonia (Graham and Wilcox, 1993; Conway and Trainor, 1972). Inoltre la parete cellulare è dotata di escrescenze ed ornamenti composti da elementi multipli (Bica et al., 2012), il cui significato tassonomico e funzionale non è ancora stato chiarito (Bisalputra et al., 1964). L'adesione tra le cellule della colonia è garantita da una guaina trilaminare composta da cellulosa e pectina; la parete cellulare risulta come strato più esterno ed è composta da algenani che ne garantiscono un'elevata resistenza (Pickett-Heaps e Staehelin, 1975). In associazione ad altre microalghe verdi quali *Pedastrium* spp. e *Tetraedron* spp., questi composti sono stati ritrovati in sedimenti lacustri come depositi fossili (Gelin et al., 1997). Le cellule contengono un singolo plastidio con un pirenoide e sono uninucleate. La riproduzione asessuata avviene attraverso la formazione di autocolonie coinvolgendo aplanospore immobili o zoospore biflagellate; queste ultime sono state ritrovate in specie soggette a limitazione di nutrienti (Trainor and Burg, 1965, Trainor, 1963). La cellula parentale si divide tramite mitosi successive fino a determinare

la formazione di 4 nuovi organismi che si allineano lateralmente. Le cellule della progenie sono rilasciate attraverso rottura della parete cellulare della cellula madre che rimane vuota (ghost cell); queste ne utilizzano gli strati, durante o subito dopo il rilascio da essa, per l'eventuale aggregazione in colonia (Pickett-Heaps e Staehelin, 1975). La formazione di cellule singole o di colonie è dipendente da diversi fattori quali l'elevata temperatura e intensità luminosa, la carenza di nutrienti e la presenza di erbivori come *Daphnia*. Le cellule entrano in modalità difensiva, quando i loro predatori producono un composto che funge da segnale di allarme. L'aggregazione in colonie porta ad un rallentamento del tasso di crescita (Lürling, 1999), ma consente una miglior protezione dalla predazione dello zooplankton. Altri meccanismi di difesa della colonia sono: ispessimento della parete cellulare, secrezione di mucillagine, presenza di spine e setole e produzione di composti tossici quali saponine e alcaloidi (Lürling, 1999). E' inoltre in grado di crescere in acque leggermente eutrofiche, ragion per cui questa specie è utilizzata nel trattamento di acque reflue (Samorì et al., 2013). Nelle specie appartenenti all'ordine delle *Sphaeropleales*, è comune la presenza di abbondanti concentrazioni di acidi grassi saturi ed insaturi quali acido palmitico, acido linolenico, acido oleico e l'assenza di acido docosaesaenoico (DHA). Sperimentalmente è stata ritrovata anche un'elevata concentrazione di acido palmitoleico, la cui funzione biologica è responsabile sia di resistenza ai batteri sia di tossicità nei confronti degli erbivori (Desbois et al., 1998). E' stata osservata un'elevata capacità di assorbimento di composti quali metalli pesanti che stimolano la produzione di lipidi all'interno della cellula; sotto privazione di azoto è favorito questo accumulo (Rodolfi et al., 2008). La rapida crescita, l'elevata competitività e capacità di adattamento, rende questa specie facilmente gestibile e coltivabile. L'applicazione più comune è il trattamento di acque reflue domestiche ed industriali, ma promettente è il possibile utilizzo nella produzione di biodiesel. L'identificazione tassonomica di questa specie è stata oggetto di importanti dibattiti e fonte di confusione fino all'avvento delle tecnologie molecolari. *Desmodesmus communis* è spesso confusa con una specie molto simile, *Scenedesmus* spp. Entrambe unicellulari, cenobiali e facenti parte del pico e nanoplankton (Wolf et al., 2002) con ampia distribuzione in acque dolci di climi temperati, variano nel fenotipo, nel numero di cellule della colonia, nella forma, negli ornamenti (Hegenwald, 1997) e differiscono per la tipologia e numero di spine (Lürling, 1999). La confusione tassonomica è stata generata dal fatto che, per composizione chimica e morfologia le 2

microalghe (*Scenedesmus* e *Desmodesmus*) sono piuttosto simili; grazie allo sviluppo e al perfezionamento delle tecnologie molecolari, quali l'analisi filogenetica della struttura secondaria della regione IT-S 2 (Samorì et al., 2013), è stato possibile suddividere queste 2 microalghe in due sottogeneri: sottogenere *Scenedesmus* e sottogenere *Desmodesmus*, entrambi appartenenti al genere *Scenedesmus* (Hegenwald, 2000). Inizialmente, infatti *Desmodesmus communis* fu classificata come *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson, successivamente come *Scenedesmus communis* (Hegenwald, 1977); attualmente è una delle 57 specie del genere *Desmodesmus*, autenticato nel 1998 da Hegenwald e Tsarenko. Di questa specie è possibile inoltre trovare 2 varianti: *Desmodesmus communis* VAR. RECTANGULARIS (G.S. West) e VAR. POLISICUS (Tsarenko P. e Hegenwald E.) (www.algaebase.org).



Fig. 6 Microfotografia (100x) di *Desmodesmus communis*.

2.5 Ormoni

Come precedentemente esposto l'obiettivo principale delle diverse ricerche applicative, è l'ottimizzazione della crescita microalgale al fine di incrementare la biomassa ed ottenere maggiori quantità di prodotti. L'incremento della biomassa può essere operato grazie all'utilizzo di nutrienti (Jin et al., 2005) e fitormoni (Tarakhovskaya et al., 2007). E' stato dimostrato che tutti gli organismi vegetali sono in grado di produrre fitormoni con diverse funzioni, quali regolazione metabolica (Kobayashi e Ishibashi, 1999). I fitormoni sono composti organici di origine naturale o sintetica, sintetizzati dagli organismi vegetali,

che ne influenzano i processi di crescita, il differenziamento e lo sviluppo. Tutti gli ormoni hanno effetto a basse concentrazioni e non sono prodotti da tessuti specializzati; i centri di produzione sono infatti multipli consentendo alla sostanza di agire non solo a distanza, ma anche nello stesso sito di produzione. Differentemente dagli organismi animali, la produzione e la secrezione di questi non è coordinata da un unico centro di controllo. Ogni fitormone ha una vasta gamma di attività ed agisce su più siti con diverse funzioni; la sua azione ha effetti differenti nei diversi tessuti che possono dipendere anche dall'interazione con altri ormoni. Chimicamente sono molecole sintetizzate da diverse vie metaboliche e hanno quindi strutture diverse. La sintesi di questi composti avviene nei cloroplasti (Davis, 2004). Ad oggi sono stati identificati diversi gruppi di ormoni nelle piante superiori e nelle alghe; per quest'ultime, le conoscenze dei meccanismi d'azione sono frammentarie, mentre a partire dagli anni '60, importanti ricerche hanno permesso l'individuazione e la conoscenza dell'attività biologica nei principali gruppi algali. Di questa identificazione si possono distinguere 5 classi di fitormoni in senso stretto (auxine, citochinine, gibberelline, acido abscissico, etilene e più recentemente i brassinosteroidi **Fig. 7**), mentre gli altri composti sono definiti sostanze di crescita.

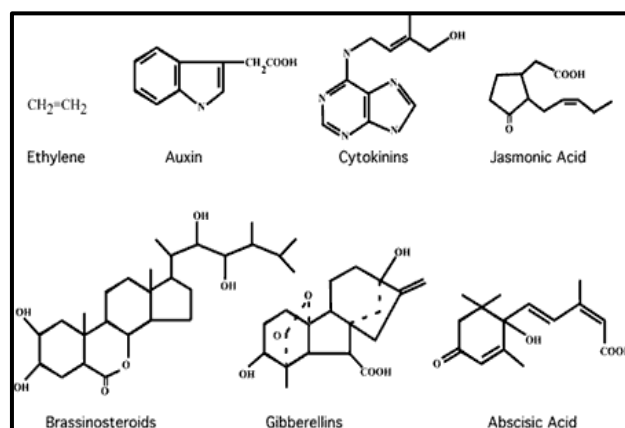


Fig. 7 Struttura chimica dei più noti fitormoni vegetali.

2.5.1 Auxine

Composti naturali e sintetici con in comune la presenza del gruppo chimico dell'indolo; la principale auxina naturale è l'acido indol-3-acetico (IAA), prima auxina ad essere scoperta. Negli anni '70 si scopre il gruppo delle Cloroauxine, (4-Cl-IAA) e successivamente è stato scoperto l'acido fenilacetico (PAA). La sintesi di questi composti avviene attraverso la via

di biosintesi dell'aminoacido triptofano. L'acido 1-naftalenacetico (NAA), l'acido-2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) e l'acido indol-3-butilirrico (IBA) sono di origine sintetica. Le principali azioni delle auxine, nelle piante superiori, sono di stimolo nei processi di accrescimento e divisione cellulari, quali:

- Distensione cellulare (accrescimento per allungamento cellulare)
- Fototropismo (accrescimento per distensione cellulare verso la fonte luminosa) e geotropismo (risposta alla forza di gravità)
- Crescita di radici, anche laterali e avventizie
- Dominanza apicale (fenomeno in cui l'apice vegetativo inibisce e controlla lo sviluppo delle gemme laterali, regolando la forma della pianta stessa)
- Inibizione della caduta fogliare
- Ripresa vegetativa (ripresa della crescita stagionale dopo una fase di riposo)
- Regolazione dello sviluppo dei frutti
- Induzione della sintesi di etilene
- Regolazione del ciclo cellulare vegetale (replicazione del DNA)

Nelle alghe questi composti sono stati trovati a concentrazioni inferiori rispetto alle piante superiori (Basu et al, 2002). La funzione fisiologica è la medesima: promuovono l'accrescimento e la divisione cellulare. Nelle macroalghe rosse e brune stimolano la crescita del tallo e favoriscono la dominanza apicale (Yokoya, 1996), promuovono la rizogenesi di alghe verdi quali *Bryopsis plumosa* (Provasoli e Carlucci, 1974) e inducono la formazione delle strutture riproduttive (polarizzazione e germinazione dello zigote) di *Fucus* spp. (Dring, 1974). Nelle microalghe e nei cianobatteri stimolano la crescita (Provasoli e Carlucci, 1974), ma è stato dimostrato che l'IAA ha effetti solo a basse concentrazioni (1mg/L) sul genere *Codium* spp.; non ha effetti invece su microalghe come *Chlorella* spp. ed *Euglena* spp. Sperimentalmente si è osservato come l'utilizzo esogeno di questi ormoni favorisca l'aumento di biomassa sulla microalga verde *Chlorella sorokoniana* (Hunt et al., 2010); i risultati mostrano come le auxine siano in grado di sopprimere il processo di ossidazione cellulare e di biosintesi di pigmenti foto sintetici, ritardando la senescenza. In questo senso una biomassa con meno pigmenti è favorita per una potenziale produzione di biodiesel, in quanto questi composti interferiscono con l'estrazione dei lipidi algali. Inoltre è stato osservato come l'acido fenilacetico favorisca

l'accrescimento cellulare prolungando la fase esponenziale e riducendo la fase lag, senza interferire sulla dimensione delle cellule (Hunt et al., 2010, Brannon and Bartsch , 1939). Su colture axeniche di microalghe verdi quali *Scenedesmus armatus*, e *Chlorella pyrenoidosa* si è osservato che l'IAA favorisce la formazione di colonie con 4 cellule rispetto a colonie con 2 cellule, anche se non è un composto rilevante per la formazione di cenobi. Inoltre favorisce la formazione di autocolonie in *Scenedesmus quadricauda* (Mazur et al., 2001). Esistono inoltre composti come l'indometacina, che chimicamente sono analoghi alle auxine e svolgono un'attività fisiologica che favorisce la crescita e la fotosintesi in microalghe verdi come *Chlorella vulgaris* (Piotrowska et al., 2012).

2.5.2 Citochinine

Le citochinine sono ormoni che stimolano la divisione cellulare e comprendono più di 40 composti che nelle piante superiori sono sintetizzate nell'apice radicale, mentre nelle alghe la sintesi avviene nel cloroplasto. Chimicamente sono classificate in due categorie:

- citochinine di tipo purinico con struttura simile a quella dell'adenina, naturali come la zeatina (primo composto ad essere isolato nel 1964 nel mais), isopenteniladenina e diidrozeatina e di origine sintetica come la chinetina o cinetina.
- citochinine di tipo non purinico con struttura di base simile alla fenilurea come CPPU (N cloro piridil urea) e TDZ (tidiazuron)

Entrambe le categorie sono presenti in forma attiva se sono fosforilate o in forma inattiva se sono coniugate. Possono ritrovarsi anche come componenti di alcuni tRNA. Le vie biosintetiche che originano questi composti sono differenti dalle vie di sintesi delle piante. Sono presenti in tutti i tessuti giovani in rapido accrescimento come nei semi, negli apici radicali, ma anche in foglie e frutti giovani e agiscono in combinazione o in opposizione alle auxine. La loro attività fisiologica in vivo comprende:

- Stimolazione della divisione cellulare
- Promozione della maturazione dei cloroplasti
- Stimolazione dell'assunzione di nutrienti
- Ritardo nella senescenza fogliare

- Induzione della formazione di germogli in particolare i germogli ascellari
- Regolazione del ciclo cellulare vegetale (mitosi)
- Inibizione nella formazione delle radici (in opposizione alle auxine)
- Aumento della produzione di clorofille ed enzimi fotosintetici

Sperimentalmente è stato dimostrato che il rapporto auxina/citochinina regola la morfogenesi nelle colture in vitro di tessuti. Questi fitormoni sono stati ritrovati sia in alghe brune come *Fucus* spp. (Stirk et al., 1997), sia in microalghe verdi come *Scenedesmus* spp. (Sitnik et al., 2003). Nelle sole alghe rosse sono presenti singolarmente o in sinergia con le auxine dove hanno il medesimo ruolo fisiologico di stimolazione della divisione cellulare e della fotosintesi (Tarakhovskaya e Maslov, 2004) e formazione del callo.

2.5.3 Gibberelline

Le gibberelline sono una grande famiglia di composti (indicata con la sigla GA's) che conta più di 70 molecole. Chimicamente sono formate da una complessa struttura terpenica ciclica che rende difficoltosa la produzione di analoghi sintetici efficaci; mostrano lievi differenze strutturali e possono essere convertite le une nelle altre. Sono biosintetizzate a partire dall'isopentenil pirofosfato e la gibberellina più importante e diffusa è l'acido gibberellico (GA). È stata isolata per la prima volta nel 1926 in Giappone da un fungo parassita del riso (*Gibberella fujikuroi*). Nelle piante superiori è prodotta dai meristemi apicali e subapicali del fusto e delle radici, nelle foglie giovani e nei semi immaturi. La loro attività fisiologica influenza la divisione cellulare e la crescita; come le citochinine, agiscono in sinergia con le auxine nella stimolazione della moltiplicazione ed estensione cellulare e nell'induzione della partenocarpia, stimolano la germinazione dei semi e del polline, l'accrescimento dei frutti e lo sviluppo delle gemme, regolano la fioritura e inducono l'allungamento degli internodi, ritardano la senescenza fogliare, inibiscono la formazione delle radici e interrompono la quiescenza dei semi. In alghe brune e rosse favoriscono la crescita, l'aumento e le ramificazioni del tallo, mentre in altre alghe rosse come *Grateloupia doryphora* hanno un effetto inverso quale soppressione del tallo e organogenesi dei tessuti (García-Jiménez et al., 1998). Si presume che svolgano un

controllo nell'assimilazione di sostanze esogene quali azoto e carbonio inorganico favorendo l'accumulo di proteine e microcistine in cianobatteri (Pan et al., 2008) .

2.5.4 Acido Abscissico

Chimicamente appartiene alla famiglia dei sesquiterpeni, derivati dall'isoprene; si origina dall'acido mevalonico ed è un prodotto di degradazione di carotenoidi e xantofille. E' stato isolato per la prima volta nel 1960 con il nome di *abscissina* in quanto promuove l'abscissione; non sono ancora chiari i siti di produzione nelle piante, ma si accumula nei cloroplasti di foglie mature e nei frutti poco prima del distacco, nelle gemme, nei semi quiescenti e nelle radici. È considerato un ormone inibitorio, in quanto l'acido abscissico (ABA) è il diretto antagonista degli ormoni della crescita (auxine, gibberelline, citochinine) agendo da regolatore negativo:

- Regola l'abscissione e la senescenza (quest'ultimo è un effetto indiretto perché aumenta la formazione di etilene che stimola il distacco)
- Inibisce l'accrescimento della pianta
- Favorisce la risposta agli stress e chiusura degli stomi in presenza di stress idrico
- Regola l'assorbimento ionico e dell'acqua, la dormienza delle gemme e dei semi
- Stimola l'accrescimento radicale
- Previene l'apertura degli stomi in presenza di luce

In alcune alghe è stato trovato un composto chiamato acido lunularico che svolge la stessa attività fisiologica di ABA (Pryce et al., 1972, Hiromichi et al., 2002). ABA è invece presente in molte microalghe verdi quali *Chlorella* spp., *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*; in quest'ultimo organismo induce la formazione di cisti, la sintesi e l'accumulo di carotenoidi. Nelle alghe brune del genere *Laminaria* spp., favorisce lo sviluppo dei tessuti riproduttivi con un controllo stagionale; infatti ABA è prodotto maggiormente in condizioni di stress quali aumento della salinità e abbassamento dell'umidità (Tominaga et al., 1993, Kobayashi et al., 1997).

2.5.5 Etilene

L'etilene (o etene) è il più semplice degli alcheni; la sua formula chimica è C_2H_4 ed è sintetizzato a partire dall'amminoacido metionina in un ciclo metabolico chiamato Ciclo di Yang; i fattori di controllo nella sintesi di questo composto sono i parametri ambientali. E' un fitormone biologicamente attivo a concentrazioni molto ridotte e lo si trova in forma gassosa in tutti gli spazi intracellulari. L'attività dell'etilene è inversamente proporzionale alla concentrazione di anidride carbonica che satura l'ambiente. Come per ABA anche questo composto svolge un'attività da regolatore negativo influenzando sulla germinazione e la senescenza dell'organismo:

- Regola l'abscissione e i fenomeni di invecchiamento (sviluppo dei germogli, maturazione dei frutti e caduta delle foglie inducendo un cambiamento del loro colore e della composizione chimica)
- Provoca l'inibizione della divisione cellulare e dell'allungamento
- Interrompe la dormienza di semi e gemme
- Abolisce il geotropismo positivo delle radici (un'inibizione della crescita verticale in associazione ad un ispessimento dello stelo e una disattivazione del gravitropismo e quindi della crescita in direzione della gravità)
- Funge da "segnale" d'allarme chimico-fisico in caso di infestazioni della pianta da parte di parassiti nonché di rotture o storture. Insieme ad altre sostanze quali l'acido salicilico, l'etilene marchia la zona danneggiata e stimola la produzione di fitotossine. Essendo un gas, e quindi diffondendosi, l'etilene "mette in allarme" stimolando reazioni a cascata anche le parti della pianta prossime e le piante vicine

L'etilene è stato rilevato anche in molte specie di alghe; i produttori più attivi appartengono ai generi di *Porphyra* spp., *Acetabularia* spp., *Codium* spp., e *Dunaliella salina* (Cooke et al., 2002). E' stato osservato che in *Scenedesmus quadricauda* favorisce l'aumento della crescita a concentrazioni molto ridotte ($0,001-1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incrementa il livello di RNA all'interno della cellula (concentrazioni pari a $0,1 \text{ mg}$) (Chapman and Vance, 1976); stimola inoltre l'incremento della divisione cellulare nella diatomea *Nitzschia putrida* (Abeles, 1973). In condizioni sperimentali, si è riscontrato un aumento della

concentrazione endogena di etilene pari a 3.3 M/mg nel cianobatterio *Anabena flosaquae* quando il mezzo di coltura era carente di fosforo (Fitzgerald e Uttormark, 1974). Si suppone che in limitazione di fosforo un aumento di etilene favorisca comunque la sua assunzione.

2.5.6 Composti ormono-simili

Diversi composti con attività biologica analoga ai fitormoni, quali acido jasmonico, poliammine, brassinosteroidi e acido salicilico, sono stati scoperti solo alla fine del ventesimo secolo; ragion per cui le informazioni inerenti alla loro struttura, meccanismi di biosintesi e proprietà, risultano essere limitate, soprattutto per quanto riguarda gli organismi algali. Tuttavia, vi è una crescente evidenza che diversi microrganismi, quali alghe, batteri e funghi, sono anche in grado di produrre questi sostanze (Zakharychev, 1999).

L'acido jasmonico è una sostanza di crescita sintetizzata a partire dall'acido linolenico. Regola i processi di inibizione della crescita, di senescenza e di abscissione fogliare. L'acido jasmonico ed alcuni suoi derivati come lo jasmonato di metile, svolgono un importante ruolo nella risposta al ferimento dell'organismo e della sua resistenza sistemica ai patogeni (Nedeva et al., 2008). Questi composti sono infatti in grado di indurre nelle piante, o nelle colture cellulari vegetali, la produzione di metaboliti secondari implicati nella difesa chimica. Nella alga bruna *Fucus* spp. l'acido jasmonico induce la produzione di polifenoli utilizzati come difesa dallo zooplancton (Arnold et al., 2001). E' stato inoltre individuato in cianobatteri (*Spirulina*) ed alghe verdi (*Chlorella* spp.).

Le poliammine sono composti organici aventi due o più gruppi amminici. Le più comuni sono putresceina, spermidina, spermina e cadaverina (**Fig. 8**). La sintesi delle poliammine prevede dapprima la formazione di putrescina attraverso la via metabolica della sintesi dell'amminoacido arginina. Spermidina e spermina derivano direttamente dalla putrescina, mentre la cadaverina deriva dalla via metabolica dell'amminoacido lisina. Nelle piante superiori questi composti sono in grado di indurre lo sviluppo di alcuni frutti, ridurre lo stress idrico e attrarre gli insetti impollinatori per favorire l'impollinazione entomofila. La concentrazione di questi composti nelle alghe è la medesima ritrovata nelle piante (50-150 µg/gr fr wt) (Sacramento et al., 2004), così come le loro vie di sintesi. Diversi studi

mostrano come stimolino la crescita di macrofite, favorendo la crescita e la morfogenesi: è stata osservata un'attività positiva di stimolazione della sporulazione in talli maturi da parte della spermina sull'alga rossa *Doryphora* spp. (Márian et al., 2000). Nelle microalghe, le poliammine sono regolatori di processi cellulari e metabolici: stimolano il trasporto attivo di metaboliti e influenzano il funzionamento di enzimi, di pompe ioniche e del processo fotosintetico (Hunt et al., 2010, Logothetis et al., 2004) .

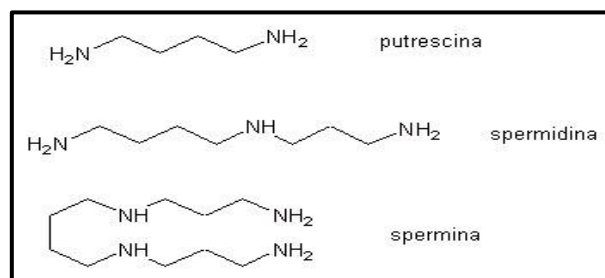


Fig. 8 Struttura chimica delle poliammide.

I brassinosteroidi (BR) sono sostanze di crescita facenti parte della classe dei polioidrossisteroidi. Nelle piante questi composti sono sintetizzati tramite il percorso del mevalonato (come altri terpenoidi quali ABA), con la formazione di una grande varietà di intermedi. Questo percorso non è stato tuttavia identificato nelle microalghe. Recentemente inseriti nella classe dei fitormoni, hanno effetti sull'accrescimento delle piante, distensione e divisione cellulare aumentando la sensibilità all'auxina, morfogenesi, sviluppo riproduttivo, senescenza e risposte agli stress. 24-Epicastasterone e 28-Homocastasterone sono due brassinosteroidi ritrovati anche nelle alghe (*Hydrodictyon reticulatum*), con la stessa concentrazione presente nelle piante superiori (0,3-4 g/Kg) (Bajguz et al., 2003). Studi sperimentali mostrano come queste molecole aumentino la crescita, l'accumulo proteico e di acidi nucleici e stimolando il processo fotosintetico in *Chlorella* spp.

2.6 Scopo della tesi

La coltivazione massiva di microalghe è un'attività che ha lo scopo di produrre biomassa su larga scala per ottenere prodotti e processi utili. Le microalghe contengono carboidrati, proteine, lipidi, pigmenti e altri composti utilizzati a livello industriale in campo alimentare, cosmetico, medico e nutraceutico. Dalle microalghe è possibile estrarre lipidi da utilizzare come biocarburanti per produrre energia ecocompatibile, anche se la tecnologia è ancora in fase embrionale. L'obiettivo di nuove linee di ricerca è quello di incrementare la biomassa algale allo scopo di ottenere maggiori quantità dei prodotti desiderati. Questo può essere realizzato attraverso l'uso di sostanze di crescita che diversi studi mostrano come siano presenti naturalmente nelle microalghe. Lo scopo di questa tesi è quello di valutare gli effetti di ormoni vegetali sulla crescita e la composizione molecolare della microalga verde *Desmodesmus communis*, organismo noto nell'ambito del trattamento delle acque reflue e promettente alternativa nella produzione di biodiesel grazie alle sue caratteristiche fisiologiche. Attualmente, gli studi svolti sull'effetto delle sostanze di crescita sono ridotti; per questa ragione è stato effettuato dapprima uno screening preliminare di cinque fitormoni di differente natura (due auxine, una gibberellina e due poliammine) a concentrazioni diverse, su colture monospecifiche di *Desmodesmus communis*. Lo scopo di questo screening è stato quello di selezionare l'ormone con un effetto fisiologico evidente sulla coltura; successivamente sono stati condotti esperimenti su piccoli e medi volumi al fine di determinare l'aumento di biomassa ed un aumento della resa lipidica per un'eventuale futura applicazione su scala industriale.

3.1 Materiali e metodi

3.1.1 Screening preliminare

3.1.1.1 Allestimento delle colture

La coltura di *Desmodesmus communis* è stata isolata da acque interne locali nella provincia di Forlì-Cesena. L'adattamento è avvenuto in una beuta da 250 mL con Medium Chu13 modificato (in cui la fonte di azoto è NH_4Cl in sostituzione di KNO_3) sterilizzato (**Tab. 4**) (Largeau et al., 1980), in camera termostata, a 20 °C e sotto illuminazione con lampade a luce fredda ($110\text{-}120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$, luce/buio 12/12 h). L'allestimento delle colture batch (sistema chiuso in cui i nutrienti sono aggiunti solo all'inizio) alle diverse condizioni di crescita è stato ottenuto attraverso gli inoculi di volume noto derivanti dalla coltura della beuta madre una volta adattata (quando la coltura algale ha raggiunto la fase stazionaria). Sono state allestite altresì colture con lo stesso terreno privo di ammonio, ma arricchito con nitrati. Ogni condizione è stata riprodotta in triplicato in tubi da 30 mL; il mantenimento delle colture, poste su un agitatore magnetico elettronico (VELP Scientifica) per prevenire la sedimentazione cellulare, è avvenuto in camera termostata. Tutti i parametri ambientali sono stati mantenuti stabili nel corso dell'esperimento. Le sostanze di crescita sono state sciolte in un solvente (in questo caso metanolo, che nella percentuale utilizzata non ha effetto sulla crescita dell'alga) e filtrate a $0,22 \mu\text{m}$ per evitare contaminazioni batteriche; la conservazione di quest'ultime è avvenuta al buio a 4 °C. Le concentrazioni utilizzate sono state stabilite sulla base della bibliografia presente su questo argomento e per ogni ormone ne sono state scelte due: acido fenilacetico (PAA 30 mg/L-15 mg/L), acido naftalencetico (NAA 5 mg/L-2,5 mg/L), putrescina (PUT 0,1 mg/L-0,05 mg/L), spermidina (SPM 0,1 mg/L-0,75 mg/L), acido gibberellico (GB 10 mg/L-5 mg/L) (Hunt et al., 2010). Le analisi svolte per la quantificazione della biomassa algale, sono state effettuate ogni 5 giorni su un totale di 15 giorni per ogni condizione ed hanno previsto: determinazione del peso secco, torbidità, pH, conteggio cellulare e valutazione dell'efficienza fotosintetica.

3.1.2 Esperimento in colture batch

3.1.2.1 Allestimento delle colture

L'adattamento della coltura di *Desmodesmus communis* per questo esperimento è avvenuto in una beuta da 500 mL miscelando la coltura di *Desmodesmus communis* di partenza (vedesi paragrafo precedente) con la coltura della stessa microalga adattata in terreno con nitrati (Largeau et al., 1980) (**Tab. 4**). Sono stati inoltre aggiunti 400 mL di terreno misto, Medium Chu13 modificato sterilizzato contenente ammonio e nitrati (Largeau et al., 1980). La concentrazione iniziale di azoto (sia ammoniacale sia sotto forma di nitrato) è stata 28 mg/L, mentre quella di fosforo è stata 9 mg/L. Le fonti di azoto selezionate sono state scelte sulla base della loro presenza all'interno di reflui industriali e agrozootecnici, dove potrebbe essere impiegata la specie algale oggetto di questo studio per la sua capacità fisiologica di depurazione. Il mantenimento della coltura è avvenuto in camera termostata a 25 °C e sotto illuminazione con lampade a luce fredda ($100\text{-}120\text{ }\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$, luce/buio 12/12 h). Tutti i parametri ambientali sono stati mantenuti stabili nel corso dell'esperimento. La beuta madre è stata agitata attraverso un sistema magnetico che mantenesse la sospensione algale continua e areata con filtri di $0,22\text{ }\mu\text{m}$ attraverso insufflazione di CO_2 per mantenere condizioni di sterilità. Successivamente sono stati prelevati 400 mL di coltura dalla beuta madre ed inseriti in una bottiglia di vetro da 1L Ilmabor® a cui è stato aggiunto lo stesso terreno misto della beuta. Per il mantenimento della coltura della bottiglia sono stati mantenuti i parametri descritti in precedenza. Trascorso il periodo necessario di adattamento, per l'allestimento dell'esperimento basato sulle colture batch, dalla bottiglia è stato prelevato un quantitativo di coltura di volume noto e inserito in bottiglie da 1L Ilmabor® con tre varianti diverse del terreno Chu13 modificato; una coltura arricchita con nitrati, una con ammonio e una con ammonio a cui è stato aggiunto l'ormone acido fenilacetico alla concentrazione di 15mg/L. Ogni condizione è stata riprodotta in triplicato e la concentrazione di cellule algali aggiunta era pari a 0,25g/L. Il mantenimento delle colture così allestite è avvenuto anche'esso in camera termostata e con la stessa procedura di mantenimento della beuta e bottiglia madre (**Fig. 9**); l'unica variante risulta nell'aggiunta di aria/ CO_2 insufflata in un rapporto pari a 98/2 (v/v). Le analisi per queste colture batch si sono svolte quotidianamente per la durata di 14 giorni ed hanno previsto: misurazione del peso secco, torbidità, pH, conteggio cellulare, valutazione dell'efficienza fotosintetica, biovolumi e analisi dei nutrienti. La determinazione del contenuto cellulare

(carbonio, azoto, fosforo, proteine, polisaccaridi e lipidi) è avvenuta utilizzando i campioni del quattordicesimo giorno.

Composto	mg/L ⁻¹
KNO ₃	200
NH ₄ Cl*	107
K ₂ HPO ₄	40
MgSO ₄	10
CaCl ₂ •2H ₂ O	54
CaCl ₂ •6H ₂ O	80
C ₆ H ₅ FeO ₇	10
Acido citrico	100
H ₃ BO ₃	0,5
MnSO ₄ •4H ₂ O	0,5
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,02
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,05
CoSO ₄ •2H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,02
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	0,02

Tab. 4 Composizione chimica del terreno di coltura Chu 13 per *Desmodemus communis*. Fonte: Largeau et al., 1980
 NH₄Cl*: indica la modifica apportata aggiungendo azoto ammoniacale in sostituzione del nitrato.



Fig. 9 Condizioni sperimentali dei tre diversi trattamenti di *Desmodemus communis*

3.1.3 Esperimento in fotobioreattore

3.1.3.1 Allestimento delle colture

La crescita di colture algali in volumi medi (70 L) è avvenuta utilizzando due fotobioreattori anulari a colonna verticale con illuminazione interna e rimescolamento ad aria/CO₂ della ditta M2M Engineering (NA) (**Fig. 10**). I fotobioreattori, di plexiglas e alluminio, sono dotati di illuminazione interna prodotta da 4 lampade fluorescenti T8 da 30 W, sistemate all'interno del reattore il cui diametro è di 20 cm. Tali lampade sono controllate da una centralina esterna che regola l'intensità luminosa (impostata tra i 300-350 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) e il fotoperiodo (luce/buio 12/12 h). Per prevenire la sedimentazione cellulare il rimescolamento costante è avvenuto attraverso gorgogliamento dal basso della miscela aria/CO₂ (98/2 v/v). Il flusso è stato regolato da un manometro esterno, mentre l'aggiunta di CO₂ è stata controllata attraverso un'elettrovalvola all'interno del sistema di distribuzione dell'aria. All'interno del reattore è presente una sonda che misura in continuo i valori del pH e della temperatura, che tramite sistema di controllo esterno può essere regolato. La struttura del fotobioreattore è stata costruita in modo tale che le alghe compiano un percorso circolare dal basso verso l'alto favorendo un maggiore rimescolamento anche dei nutrienti, evitare il reciproco ombreggiamento (Suh e Lee, 2003) e aumentare l'efficienza degli scambi gassosi per migliorare il controllo delle condizioni di crescita (Eriksen, 2008). Guarnizioni in gomma hanno sigillato ed isolato il sistema dall'ambiente esterno. I gas e l'acqua in ingresso sono stati filtrati mediante un filtro multistadio fino ad 1 μm . Il sistema di pompaggio è stato pulito e sterilizzato ad ogni utilizzo e la pulizia del sistema completo è avvenuta attraverso l'uso di un liquido contenente cloro fornito dalla ditta costruttrice. L'inoculo della coltura (di $0,05 \pm 0,01$ g/L per entrambi i bioreattori) e dell'ormone acido fenilacetico (15 mg/L) ad un fotobioreattore (PBR_{+PAA}) sono avvenuti attraverso l'utilizzo di tubi collegati a pompe peristaltiche. La coltura pura di *D. communis* era contenuta in PBR-CONTROLLO. I nutrienti sono stati aggiunti alle medesime concentrazioni presenti nel terreno di coltura Chu 13 modificato utilizzato per l'esperimento in colture batch (28 mg/L per l'azoto e 9 mg/L per il fosforo) e l'aggiunta è avvenuta con il sistema sopra descritto. Questa procedura è stata ripetuta ogni 15 giorni, mano a mano che i nutrienti e l'ormone venivano consumati, rispettando le caratteristiche di un sistema semi-continuo, come nel caso dei fotobioreattori. La fonte di azoto presente nel sistema è stata l'ammonio; la scelta di non utilizzare nitrati nel terreno

di coltura è avvenuta per mezzo di esperimenti preliminari che hanno mostrato come *D. communis* preferisca l'azoto in forma ammoniacale, in quanto più velocemente assorbibile (Di Termini et al., 2011) e dal punto di vista operativo, maggiormente economico (Danesi et al., 2002). Inoltre la preferenza di utilizzo dell'ammonio rispetto ai nitrati come fonte azotata è da ritrovarsi nella sua abbondanza in reflui industriali e agrozootecnici dove trova applicazione la capacità di biodepurazione di *D. communis*; diverse ricerche mostrano come i nitrati siano abitualmente utilizzati per produrre biomassa algale, mentre l'ammonio, pur avendo una resa in termini di produttività minore, è in grado di aumentare la resa in termini di produttività lipidica (Lin e Lin 2011). I prelievi quotidiani dei campioni, riprodotti in duplicato, sono stati effettuati attraverso rubinetti a caduta. L'esperimento ha avuto una durata di circa 60 giorni e le analisi previste sono state: misurazione del peso secco, torbidità, pH e temperatura (attraverso il sistema di rilevazione elettronico del complesso), valutazione dell'efficienza fotosintetica e analisi dei nutrienti. La determinazione del contenuto cellulare (contenuto di carbonio, azoto, fosforo, proteine, polisaccaridi, clorofilla e lipidi) è avvenuta utilizzando i campioni del quarantaseiesimo e del cinquantasettesimo giorno.



Fig. 10 Condizioni sperimentali di *Desmodesmus communis* all'interno dei due fotobioreattori anulari. Da destra verso sinistra: PBR⁺_{PAA} (contenente acido fenilacetico) e PBR⁻_{CONTROLLO} (contenente la coltura pura di *D. communis*).

3.2 Determinazione del peso secco

La procedura per misurare il peso secco prevede il prelievo di una quantità nota di coltura, la sua diluizione con acqua distillata e la filtrazione sottovuoto mediante l'utilizzo di filtri di fibra di vetro (GF/C Circles Whatman™ Ø 0,47 µm) precedentemente essiccati e pesati. Dopo la filtrazione, si pongono tali dischi (su cui si sono depositate le microalghe) in stufa a 105 °C per 1 ora in modo tale da eliminare l'umidità residua. Al termine di questo processo sono posti in essiccatore sottovuoto, lasciati raffreddare per 10 minuti e nuovamente pesati, in modo da ottenere una misura del peso netto; dividendo tale valore per il volume noto inizialmente prelevato, si ottiene il peso secco (DW g/L) della coltura.

3.3 Conteggio cellulare

Il conteggio degli organismi fitoplanctonici è stato effettuato secondo il metodo di Utermöhl, attualmente l'unico metodo dotato di protocollo completo ufficiale (UNI EN 15204 Water quality - Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopi. Utermöhl technique). La procedura prevede la sedimentazione delle cellule algali presenti in un campione in camere di sedimentazione e il successivo conteggio attraverso l'ausilio di un microscopio ottico invertito con ingrandimento 32X (ISPRA, 2009). Attraverso la corretta diluizione, da ogni coltura è stata prelevata un'aliquota pari ad 1 mL e posta in un'apposita camera di sedimentazione. Dopo 20 minuti (tempo sufficiente alla sedimentazione di tutte le cellule) sono stati effettuati i conteggi attraverso transetti, che consistono nell'identificazione delle cellule algali su transetti di lunghezza pari al diametro della camera di sedimentazione (26 mm) e di larghezza pari al diametro del campo visivo e prevedono tre misure in modo da poter calcolare il numero medio di cellule fitoplanctoniche. Il calcolo della concentrazione di dette cellule si ottiene moltiplicando il numero medio di cellule per il fattore 30,4 mm (dato dal rapporto tra l'area totale della camera di sedimentazione e l'area del reticolo) per il valore ottenuto dal rapporto tra 1000 e il volume del campione sedimentato (pari ad 1 mL).

3.4 Determinazione della torbidità

E' stata determinata l'assorbanza della coltura, (misura direttamente proporzionale al numero di cellule presenti nel campione, a cui è possibile risalire attraverso curve di taratura precedentemente sviluppate) mediante misurazione della densità ottica alla

lunghezza d'onda di 750 nm (OD750 in cuvette a cammino ottico di 1 cm) utilizzando uno spettrofotometro (modello 7800, Jasco). A questa lunghezza d'onda le molecole di clorofilla non assorbono e, supponendo che la luce assorbita sia dovuta solo alla presenza di cellule, si può ricavare un'indicazione sufficientemente accurata dell'assorbanza dovuta alle cellule. Tuttavia, al termine della fase di crescita esponenziale delle microalghe, la relazione tra assorbanza e concentrazione cellulare non è molto accurata per via dell'accumulo di detriti cellulari. Per ogni coltura si preleva un volume noto di campione, dopo appropriata diluizione con lo stesso mezzo utilizzato nella coltura e si effettuano almeno 2 letture (repliche), in modo da poter ricavare una media con relativa deviazione standard.

3.5 Misurazione del pH

La determinazione del pH delle colture è stata ottenuta utilizzando un elettrodo a vetro per la misurazione del pH in soluzioni acquose (modello PHM 92, Radiometer Copenhagen). Per poter misurare il pH del campione in oggetto, è necessario calibrare lo strumento utilizzando due buffer, prima una soluzione a pH 4 e successivamente una soluzione a pH 7. Per ottenere il valore di interesse si preleva un'aliquota di volume noto di ogni coltura. Per l'esperimento in colture batch, il pH è stato mantenuto costantemente alla neutralità, regolandolo attraverso l'utilizzo di una soluzione acida di acido cloridrico e una soluzione basica di idrossido di potassio.

3.6 Valutazione dell'efficienza fotosintetica

La misura dell'efficienza fotosintetica e in particolare il rendimento del fotosistema II (PSII) è indispensabile per determinare l'effetto delle diverse condizioni di crescita a cui sono state sottoposte le colture durante gli esperimenti. I fotoni inviati dalla sorgente luminosa raggiungono le molecole di clorofilla, eccitando gli elettroni allo stato di singoletto o di tripletto; questa energia accumulata viene trasferita fra le molecole di clorofilla dell'antenna fotosintetica fino a raggiungere il centro di reazione. Non tutta l'energia giunta all'antenna viene scaricata nel centro di reazione, perché in parte è dissipata sotto forma di calore o emessa come fluorescenza (Müller et al., 2001); l'energia luminosa in eccesso può essere rilevata da un tipo particolare di fluorimetro (Maxwell e Johnson, 2000). Lo strumento impiegato è il pulse amplitude modulation fluorometer

(Walz). Prelevata una quantità nota di campione, questa viene posta al buio per 20 minuti a temperatura ambiente (22-25 °C), in modo tale che l'assenza di luce spinga le cellule ad aprire tutti i centri di reazione per essere in grado di assorbire la massima quantità possibile di fotoni in arrivo; successivamente il campione viene inserito all'interno di una cuvetta di vetro (cammino ottico 1 cm) dello strumento precedentemente settato.

L'analisi di fluorescenza si effettua con tre differenti luci:

1. Luce di misura (MB): è una luce modulata di debole intensità che permette allo strumento di rilevare la fluorescenza emessa dal campione ma non è in grado di indurre fotosintesi. L'aumento di fluorescenza passa da zero a un livello basso costante detto F_0 (livello minimo di fluorescenza) in cui si hanno tutti i centri di reazione aperti e disponibili per la fotosintesi.
2. Luce saturante (SP): è una luce di elevata intensità ($8000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ma di breve durata (600 ms) che è in grado di saturare momentaneamente la fotochimica riducendo tutti gli accettori chinonici disponibili, così da avere tutti i centri di reazione chiusi. La fluorescenza raggiunge il valore massimo F_m (valore massimo di fluorescenza). La differenza fra F_m e F_0 è detta F_v , fluorescenza variabile (Kautsky and Hirsch, 1931).
3. Luce attinica (AL): luce che permette la fotosintesi, provocando un aumento transitorio di fluorescenza a causa della riduzione dei chinoni e all'intervallo di tempo necessario perché possa iniziare l'organizzazione del carbonio (in quanto gli enzimi deputati alla fissazione necessitano di essere attivati dalla luce). Fornendo una luce continua, la fluorescenza diminuisce in quanto inizia la fotosintesi (quenching fotochimico) e si raggiunge un valore costante F_t ; se dopo un certo periodo di tempo (solitamente 5 min) si fornisce un altro flash di luce saturante (SP), si ottiene F_m' (valore massimo di fluorescenza) solitamente più basso del valore del campione adattato al buio F_m .

Da questi dati possono essere ottenute diverse misure:

- (F_v/F_m) : rendimento quantico massimo ovvero quando, dopo l'adattamento al buio,

tutti i centri di reazione sono aperti

- $(Fm' - Ft)/Fm'$: rendimento quantico effettivo del trasferimento di elettroni a livello del fotosistema II, che misura in quale proporzione la luce assorbita dalla clorofilla (efficienza dei centri di reazione del PSII alla luce) è utilizzata per la fotosintesi. Questo valore riferito alle $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di luce assorbite, serve a determinare la capacità fotosintetica in vivo (in quanto è una misura dello stato di salute delle cellule).
- $(Fm - Fm')/Fm'$: rappresenta l'energia dissipata come calore (NPQ).
- $(Fm' - Ft)/(Fm' - F0)$: quenching fotochimico (QP) che riflette lo stato redox dell'accettore primario del PSII, ovvero il QA. Rappresenta la parte di energia luminosa allo stato eccitato convertita in fotochimica dai centri di reazione attivi del PSII.
- $(Fm - Fm')/(Fm - F0)$: quenching non fotochimico (QN) che rappresenta l'energia dissipata come calore, non correlata alla fotochimica, ma legata all'energizzazione della membrana dei tilacoidi (ciclo delle xantofille).

La descrizione precedente fa riferimento alla tipica misurazione dell'efficienza fotosintetica di una sospensione algale che si basa sul metodo degli impulsi saturanti (SAT PULSE).

Quando le colture raggiungono elevati valori di efficienza fotosintetica, (corrispondenti ai giorni in cui il rendimento quantico assume i valori più alti, ad esempio nella fase esponenziale di crescita) dopo il consueto adattamento al buio viene misurato il rendimento quantico massimo; successivamente si forniscono diversi flash saturanti (SP), per un periodo di un minuto per un totale di 15 minuti. Attraverso questa sequenza di impulsi si ottengono molteplici valori di Fm' ed in questo modo è possibile eseguire le curve di induzione (**Fig. 11**). L'utilizzo di queste curve consente di avere una stima più accurata e precisa del rendimento quantico effettivo, oltre ad ottenere altri parametri che permettano di valutare le complesse prestazioni dell'apparato fotosintetico.

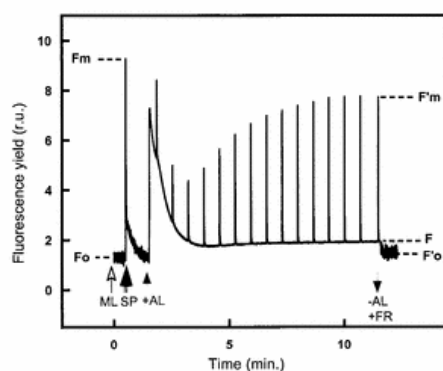


Fig.11 : rappresentazione schematica di una curva d'induzione ottenuta utilizzando il fluorimetro Pam.

3.6.1 Relazione tra intensità luminosa e processo fotosintetico

La radiazione fotosinteticamente attiva o photosynthetically active radiation (PAR), è una misura dell'energia luminosa disponibile per la fotosintesi e si concentra a lunghezze d'onda comprese tra 400 nm e 700 nm; corrisponde alla quantità di energia luminosa che raggiunge una certa area in un periodo di tempo ed è misurata come irradianza (Wm^{-2}). L'intensità luminosa influenza notevolmente la fotosintesi e questa relazione può essere espressa attraverso curve P/E o light curve (**Fig. 12**) (Kirk, 1994). La forma biochimica del grafico è una derivazione della curva di Michaelis-Menten e mostra una correlazione positiva tra irradianza e velocità del processo fotosintetico; questi sono correlati tra loro tramite il parametro del rendimento quantico fotosintetico, che rappresenta il rapporto tra le moli di O_2 prodotte per le moli di fotoni assorbiti durante la fotosintesi. La curva segue inizialmente un andamento lineare per poi giungere ad una fase di plateau. A bassi valori di irradianza (E_c), la velocità della fotosintesi netta (che sarà uguale a 0) corrisponde alla velocità del processo di respirazione cellulare (*Punto di compensazione*); al di sopra di questo valore la CO_2 presente sarà utilizzata solo per la crescita. Durante la fase lineare, l'aumento dell'intensità luminosa porta ad un aumento del tasso di fotosintesi; la pendenza della retta che ne deriva (α : moli di O_2 prodotto/quanto di luce incidente/unità di superficie) corrisponde all'efficienza con cui avviene la fotosintesi. L'aumento dell'irradianza porta ad una diminuzione della capacità di utilizzo di essa da parte della fotosintesi; ulteriori aumenti, anche piccoli, di intensità luminosa portano ad un incremento del processo fotosintetico sino al raggiungimento di una fase di plateau (P_{max}) che corrisponde alla massima velocità di fotosintesi di un organismo fotosintetico. Dall'intercetta tra α e P_{max} si ottiene il parametro E_k (irradianza di saturazione), che

corrisponde al livello di irradianza a cui la fotosintesi si satura; rappresenta il livello ottimale di fotosintesi per una determinata specie algale. L'equazione che rappresenta questa relazione è la seguente:

$$E_k = P_{max} / \alpha$$

Superata la fase di saturazione, un ulteriore aumento di irradianza porta a fenomeni di fotoinibizione/fotossidazione, in quanto l'assorbimento di luce da parte della fotosintesi supera il consumo di energia e potere riducente (ATP E NADPH) da parte del ciclo di Calvin-Benson. Per ovviare a queste importanti problematiche le alghe hanno sviluppato meccanismi di difesa come la fotoprotezione, per ridurre al minimo questi danni. Il fluorimetro Pam è altresì utilizzato per determinare questi parametri.

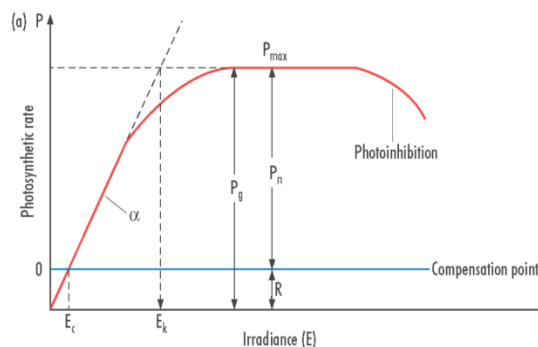


Fig. 12 Relazione tra intensità luminosa e tasso di fotosintesi netta.

3.7 Quantificazione della biomassa cellulare

Questo metodo permette una stima della dimensione cellulare dei microorganismi attraverso un'analisi morfometrica della cellula. La procedura prevede il prelievo di un'aliquota di coltura pari a 1 mL posta a sedimentare per 20 minuti in una camera di sedimentazione, analogamente al metodo del conteggio cellulare. La stima è ottenuta dalla misura dell'asse maggiore, corrispondente alla lunghezza della cellula e successivamente dalla misura dell'asse minore, corrispondente alla larghezza cellulare. Il volume ottenuto è in μm^3 assumendo sferiche le forme coccoidi e cilindriche quelle ovoidali e bastoncellari (Bratbak, 1985). *Desmodesmus communis* ha una geometria ellissoidale (**Fig. 13**) e il suo biovolume è stato calcolato con la seguente equazione (Sun and Liu, 2003):

$$V = \pi/6 * d^2 * h$$

dove d = diametro (larghezza) e h = lunghezza

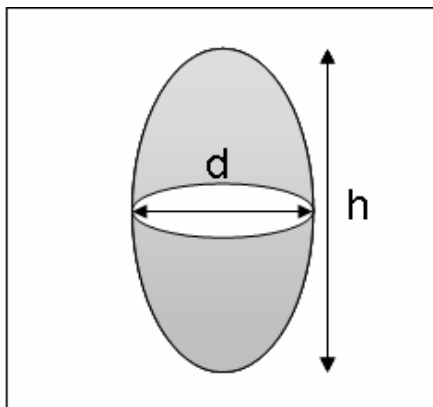


Fig. 13 Rappresentazione grafica delle misure richieste per il calcolo del biovolume di *Desmodemus communis*.

Le misure sono state ottenute su un campione di 100 cellule per ogni condizione durante la fase esponenziale dell'esperimento su colture batch.

3.8 Determinazione di ammonio e nitrati

La concentrazione di ammonio e nitrati presenti nelle colture alle diverse condizioni, sono state misurate attraverso analisi colorimetrica utilizzando dei test kits HACH che si basano sul metodo di Nessler (APHA Method 4500-NH₃ F, G) e il metodo della riduzione con cadmio (APHA Method 4500-NO₃- E, F). I campioni delle colture sono stati precedentemente filtrati utilizzando filtri GF/C Circles WhatmanTM Ø 0,47 µm; il filtrato, attraverso opportuna diluizione, è stato utilizzato per determinare la concentrazione dei nutrienti tramite spettrofotometria-uv (modello DR/2010 HACH) , la cui estinzione viene misurata ad una lunghezza d'onda compresa tra i 400 nm ed i 500 nm.

3.9 Determinazione del fosforo reattivo e del fosforo totale

La determinazione del fosforo reattivo e del fosforo totale è effettuata mediante spettrofotometria-uv (modello 7800, Jasco) attraverso analisi colorimetrica ad una lunghezza d'onda di 885 nm. Entrambe le misure sono state ottenute utilizzando il metodo dell'acido ascorbico (APHA Method 4500-P, E). Prima di utilizzare il metodo dell'acido ascorbico nella determinazione del fosforo totale, i composti fosforati sono convertiti in ortofosfati attraverso digestione acida operata dal persolfato di potassio come catalizzatore (APHA Method 4500-P, I). Come per le analisi del paragrafo precedente, i campioni delle colture sono stati precedentemente filtrati utilizzando filtri GF/C Circles WhatmanTM Ø

0,47 μm ed il filtrato, attraverso opportuna diluizione, è stato usato per la determinazione dei fosfati.

3.10 Analisi elementare CHNSO

La determinazione del carbonio organico e dell'azoto è stata effettuata mediante analisi elementare. I campioni appartenenti alle colture alle diverse condizioni sono stati filtrati mediante filtri GF/C Circles Whatman Ø 0,47 μm ed il pellet derivante è stato dapprima conservato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizzato in essiccatore (modello HETO FD. 2.5, HETOSICC) per eliminare tutta l'umidità residua ed infine pesato per misurare il peso secco prima dell'analisi CHN. I pellets appartenenti ai diversi campioni, del peso compreso tra i 2-3 mg, sono stati inseriti in un contenitore di stagno, posti all'interno dell'autocampionatore dello strumento ed analizzati da un analizzatore elementare organico (modello Flash 2000, Thermo Scientific) impostando la configurazione per la determinazione di CHNS-O. Un flusso di elio continuo, arricchito con ossigeno, porta alla fusione istantanea dei contenitori, provocando una reazione esotermica (principio su cui si basa questa analisi) in grado di ossidare completamente il campione. Perché la reazione avvenga si utilizzano dei catalizzatori (ossido di rame/rame) all'interno di una colonna verticale in quarzo (reattore di combustione). La concentrazione degli elementi viene determinata in riferimento ad una retta di calibrazione costruita con sostanze a composizione % nota e utilizzando lo standard 2,5-Bis-(5-tert-butyl-2-benzo-oxazol-2-yl) tiofene (BBOT). Ogni condizione è stata riprodotta in duplicato.

3.11 Determinazione del contenuto di clorofilla *a*

La determinazione del contenuto di clorofilla *a* è avvenuta mediante analisi spettrofotometrica, previa sua estrazione utilizzando una soluzione acetonica al 90 %. È stato filtrato un volume noto di campione per ogni condizione su filtri GF/C Circles WhatmanTM Ø 0,47 μm e tali filtri sono stati inseriti in provette di plastica con capacità di 20 mL al cui interno è stata aggiunta una soluzione acetonica al 90% preparata precedentemente e agitato vigorosamente tramite vortex, in modo da rompere il filtro e permettere al solvente di estrarre la clorofilla; la conservazione dei campioni è avvenuta al in frigo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 20 H. Il giorno successivo i campioni, a cui è stato nuovamente aggiunto acetone, sono stati rimossi dal frigo, mantenuti al buio e a temperatura ambiente

(22-25 °C) per 30' ; successivamente sono stati centrifugati (modello J2-HS, Beckman) a 3000 rpm a 20 °C per 15'. Il sovranatante così formatosi è stato raccolto ed inserito in cuvette di vetro all'interno dello strumento per l'analisi spettrofotometrica, che misura l'assorbanza del campione a 750 nm (come misura della torbidità) e a 665 nm (come misura del massimo spettro di assorbimento della clorofilla-*a*). Ogni analisi è stata riprodotta in duplicato. La stima della concentrazione di clorofilla *a* è stata calcolata utilizzando la seguente equazione (Ritchie, 2006):

$$\text{Chla (mg L}^{-1}\text{)} = 11.9035 * (\text{Abs665} - \text{Abs750})$$

Le analisi sono state condotte in duplicato per il solo esperimento su volume medi.

3.12 Determinazione del contenuto proteico

I campioni appartenenti alle colture alle diverse condizioni sono stati filtrati mediante filtri GF/C Circles WhatmanTM Ø 0,47 µm e il pellet derivante è stato dapprima centrifugato a 8000 rpm a 4 °C per 15', conservato a -80 °C, liofilizzato in essiccatore per eliminare tutta l'umidità residua ed infine pesato per misurare il peso secco. Per avere la certezza di aver rotto tutte le cellule, i campioni sono mantenuti in ghiaccio all'interno di tubi di plastica in cui è stato inserito NaOH 0,1 N e posti all'interno di un sonicatore (Sonicator Ultrasonic Processor XL, Heat Systems), che attraverso la produzione di ultrasuoni andrà a rompere definitivamente tutte le cellule. Il contenuto proteico è stato successivamente determinato utilizzando il reattivo Folin-fenolo e albumina bovina sierica come standard (BSA) (Lowry et al., 1951) seguito da analisi spettrofotometrica a 750 nm. Le analisi sono state riprodotte in duplicato.

3.13 Determinazione del contenuto polisaccaridico

L'estrazione dei polisaccaridi è avvenuta secondo il metodo di Myklestad & Haug (1972). Al volume di coltura nota prelevato, sono stati aggiunti 2 volumi di etanolo e conservati a -20 °C per 24 h. La soluzione derivante è stata centrifugata a 12000 rpm a 4° C per 15'; al pellet così ottenuto è stato aggiunto acido solforico all'80% a temperatura ambiente ed è stato nuovamente conservato a -20°C per 20h. L'analisi del contenuto polisaccaridico è avvenuta utilizzando il metodo Fenolo-Acido solforico (DuBois et al, 1956) che determina una reazione colorimetrica con successiva lettura dell'assorbanza a 485 nm. Le analisi sono state riprodotte in triplicato.

3.14 Estrazione del contenuto lipidico

L'estrazione del contenuto lipidico è avvenuta apportando delle lievi modifiche al protocollo presente in letteratura (Bligh e Dyer, 1959). I campioni appartenenti alle colture alle diverse condizioni sono stati filtrati mediante filtri GF/C Circles WhatmanTM Ø 0,47 µm e il pellet derivante è stato dapprima centrifugato a 10000 rpm a 4 °C per 15', conservato a -20 °C, liofilizzato in essiccatore per eliminare tutta l'umidità residua ed infine pesato per misurare il peso secco (circa 100 mg). Data la resistenza della parete cellulare delle microalghe si è proceduto a sonicare i campioni in una miscela di cloroformio/etanolo per tre cicli ciascuno. Al pellet liofilizzato e sonificato è stata nuovamente aggiunta una miscela di cloroformio/metanolo (2:1 v/v) e l'estrazione è stata effettuata mediante apparato di estrazione Soxhlet a 80 °C per 2 ore. Il sovranatante formatosi è stato filtrato attraverso pipette Pasteur di vetro precedentemente lavate con metanolo. Il residuo è nuovamente estratto seguendo questa procedura che è stata ripetuta 3 volte per ogni campione. Al termine del ciclo di estrazione il residuo è posto all'interno di vials di vetro precedentemente pesate e, una volta evaporato completamente il solvente, il contenuto lipidico rimanente viene misurato gravimetricamente.

4.1 Risultati e discussioni

4.1.1 Screening preliminare

E' stato eseguito un esperimento preliminare per valutare se alcune delle sostanze di crescita vegetali maggiormente utilizzate e facilmente reperibili avessero un qualche effetto sulla crescita di *Desmodemus communis* e a quale concentrazione. I risultati dello screening mostrano un generale effetto positivo sull' aumento del peso secco, ad opera dei diversi stimolanti biochimici utilizzati, rispetto al controllo (**Fig.13**): questi sono in grado di agire ed avere effetti fisiologici a bassissime concentrazioni, anche inferiori rispetto a quelle testate da Tarakhovskaya et al. (2007). Nei primi 5 giorni dell'esperimento, il maggior aumento in biomassa è stato ad opera dei trattamenti con le auxine (NAA $_{2,5 \text{ ppm}}$, NAA $_{5 \text{ ppm}}$, PAA $_{15 \text{ ppm}}$) e una poliammina (PUT $_{0,05 \text{ ppm}}$) rispetto al controllo (senza biostimolanti e con ammonio come fonte di azoto) e alla coltura algale in cui erano presenti i nitrati anziché l'ammonio. Dal giorno 5 al giorno 10, i trattamenti con le auxine ad entrambe le concentrazioni, con la poliammina PUT $_{0,1 \text{ ppm}}$ e la condizione con NO_3^- , portano ad un incremento significativo della crescita rispetto al controllo (0,23 g/L per NAA $_{2,5 \text{ ppm}}$ e 0,19 g/L per PAA $_{15 \text{ ppm}}$ rispetto a 0,15 g/L del controllo). L'aumento più consistente di biomassa al giorno 15 è osservabile ad opera delle poliammine ad entrambe le concentrazioni, nella coltura algale arricchita con NO_3^- ed un buon effetto lo si evidenzia anche per i trattamenti con auxine (PAA e NAA ad entrambe le concentrazioni).

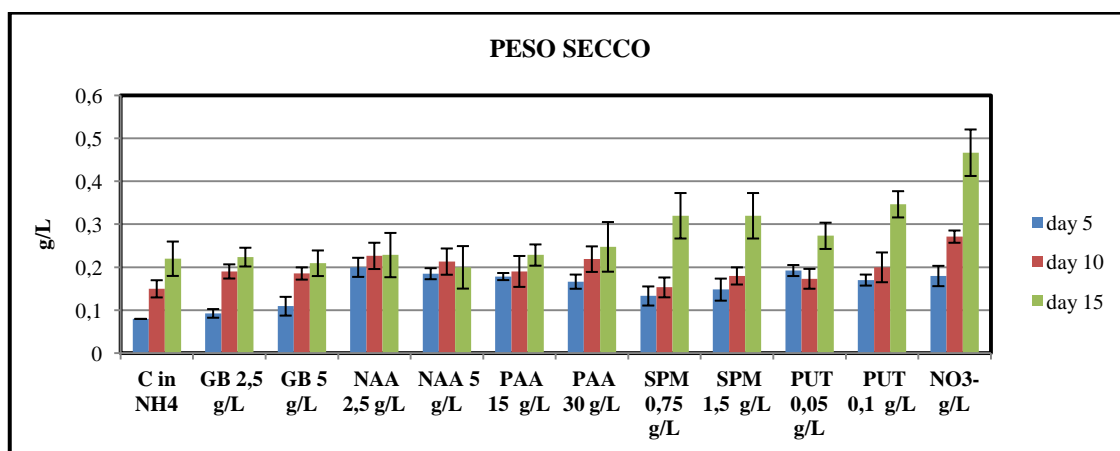


Fig. 14 Peso secco delle colture di *Desmodemus communis* sottoposte ai diversi trattamenti con stimolanti biochimici.

In Figura 15 è visibile una variazione della crescita, valutata come numero di cellule, nell'intervallo di cinque giorni, in cui è stato effettuato il conteggio cellulare e in cui si evidenzia un aumento progressivo. Questa variazione è riscontrabile anche nei valori del controllo e della coltura con NO_3^- . L'effetto di crescita maggiore, nei primi cinque giorni dell'esperimento, è ad opera delle auxine (NAA e PAA ad entrambe le concentrazioni), mentre dopo i primi dieci giorni di coltura, è osservabile anche ad opera delle poliammine (SPM e PUT ad entrambe le concentrazioni).

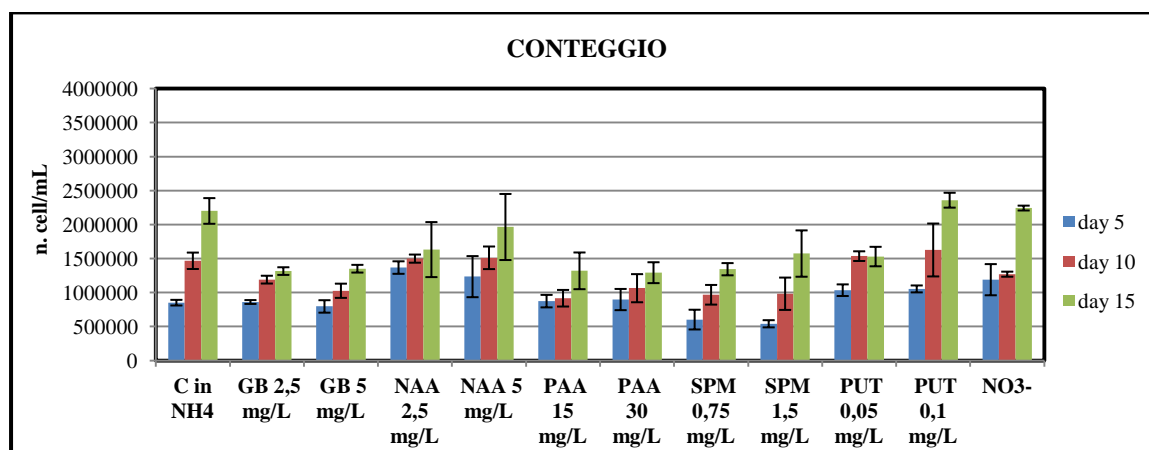


Fig. 15 Risultati del conteggio cellulare delle colture di *Desmodemus communis* sottoposte ai diversi trattamenti con stimolanti biochimici.

Nel corso dell'esperimento il pH subisce un decremento, rimanendo stabile nella coltura arricchita con nitrati e diminuendo in maniera consistente nella coltura con ammonio e in quelle con le sostanze di crescita (Fig. 16).

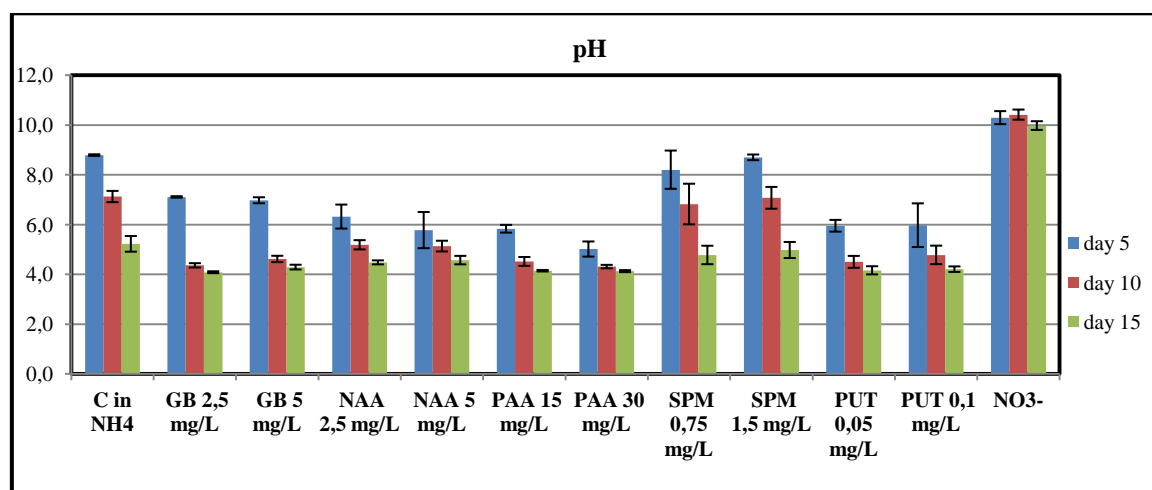


Fig. 16 Valori del pH delle colture di *Desmodemus communis* sottoposte ai diversi trattamenti con stimolanti biochimici.

4.1.2. Conclusioni

I risultati evidenziano un effetto ormonale positivo sull'aumento di biomassa ad opera delle auxine e delle poliammine. Le auxine hanno un effetto osservabile già dai primi giorni dell'esperimento; ciò suggerisce la loro capacità nel ridurre la fase lag che porta ad una diminuzione del tempo occorrente ad iniziare la divisione cellulare, favorendo il prolungamento della crescita nella fase esponenziale (Hunt et al., 2010). Al contrario, le poliammine portano ad un incremento rilevante della biomassa solo dal decimo giorno della coltura, indicando un effetto più lento. Le colture contenenti nitrati hanno subito una diminuzione inferiore del pH, che verosimilmente può portare ad un incremento della crescita. In funzione dei risultati ottenuti, dell'economicità del composto e della facilità di reperimento, è stato selezionato l'ormone acido fenilacetico (PAA) come miglior candidato per le successive prove sperimentali. E' stata utilizzata la concentrazione più bassa (15mg/L), in quanto l'effetto ormonale non varia utilizzando concentrazioni maggiori (Hunt et al., 2010).

4.2 Esperimento in colture batch

In questo esperimento si è voluto valutare l'effetto dell'aggiunta di PAA (15 mg/L) non solo sulla crescita di *D. communis*, ma anche su alcune risposte fisiologiche e sulla composizione finale della biomassa. Oltre alla condizione di controllo, contenente ammonio e a quella con l'aggiunta dell'ormone (in triplicato), sono state allestite tre beute con il nitrato al posto dell'ammonio.

4.2.1 Valutazione della biomassa cellulare

In Figura 17 è osservabile la variazione di biomassa delle colture di *Desmodesmus communis* sottoposte alle tre diverse condizioni di crescita. La coltura di *D. communis* arricchita con nitrati (condizione N) risulta essere la coltura con minor crescita dopo 14 giorni, mentre la coltura arricchita con ammonio e quella contenente l'ormone (rispettivamente condizione A e A_{+PAA}) portano ad un incremento della biomassa che risulta essere simile per tutta la durata dell'esperimento. Diverse ricerche riportano come l'ammonio sia più facilmente e più velocemente assimilabile dalle microalghe rispetto ai nitrati, a causa dell'assenza di intervento dell'enzima nitrato-reduttasi all'interno delle cellule (Xin et al., 2010) che causa dispendio di energia. Questa potrebbe essere la ragione per cui la crescita delle colture di *D. communis* in ammonio sia maggiore e più veloce rispetto alla condizione N. Il pH è stato mantenuto a valori neutri per non avere effetti evidenti sull'aumento di biomassa da parte di questo parametro. Data la similitudine nei valori di crescita della condizione A e A_{+PAA}, è ragionevole supporre che la presenza di uno stimolante biochimico in A_{+PAA} non abbia sortito effetto.

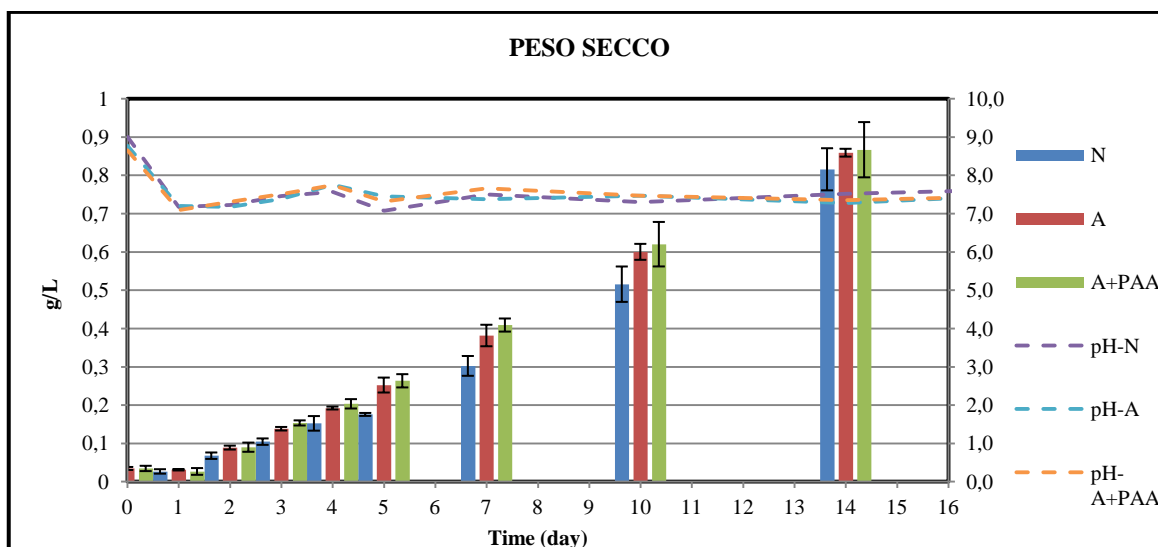


Fig. 17 Densità cellulare di *D. communis* sottoposto ai tre diversi trattamenti in funzione del tempo e valori di pH misurati nelle colture.

Valutando la crescita come numero di cellule (**Fig. 18**), la condizione N è risultata essere la coltura con maggior crescita rispetto alla condizione A e A_{+PAA}, accentuata negli ultimi giorni dell'esperimento. Attraverso il conteggio cellulare è possibile osservare il reale incremento della biomassa algale, che, per il trattamento N, può essere dovuto al più veloce raggiungimento della fase stazionaria rispetto ad i trattamenti A e A_{+PAA}. La differenza in termini di concentrazione di cellule tra le tre condizioni è molto più pronunciata dal giorno 14 dell'esperimento. La condizione A_{+PAA} contenente il fitormone, porta ad un incremento della crescita algale che risulta comunque essere inferiore rispetto ad N e A, quindi non così significativo da far supporre un concreto effetto stimolante dell'ormone stesso. I risultati ottenuti da questo studio sono in contrasto con i risultati di Li et al. (2010), in cui le colture algali arricchite con ammonio hanno una velocità di crescita più spinta rispetto alle colture algali la cui fonte di azoto siano i nitrati.

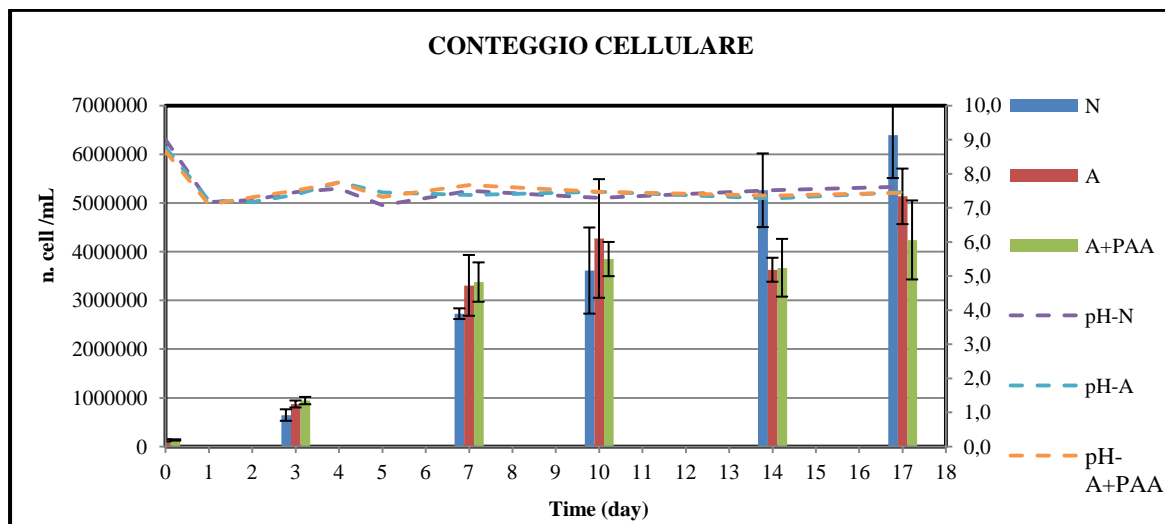


Fig. 18 Numero di cellule di *D. communis* sottoposto ai tre diversi trattamenti in funzione del tempo e valori di pH misurati nelle culture.

La discrepanza tra i due risultati precedenti potrebbe essere spiegata dai valori del volume cellulare. L'andamento delle misure del volume cellulare effettuate lungo la crescita, segue un trend positivo solo nella condizione A (Fig. 19). Il volume cellulare della condizione N tende a diminuire entro i primi 7 giorni, subendo un aumento fino al giorno 14; dal giorno 14 infine subisce un nuovo decremento. E' ammissibile supporre che, alla fine dell'esperimento, le dimensioni cellulari si siano ridotte a favore di un maggior numero di cellule algali, come riportato in Fig. 19. Il volume cellulare delle cellule del trattamento A+PAA aumenta nei primi 3 giorni, decresce fino al giorno 7 per poi subire un lieve incremento fino al giorno 17. Questo lieve effetto sulle dimensioni cellulari potrebbe essere attribuibile all'ormone presente.

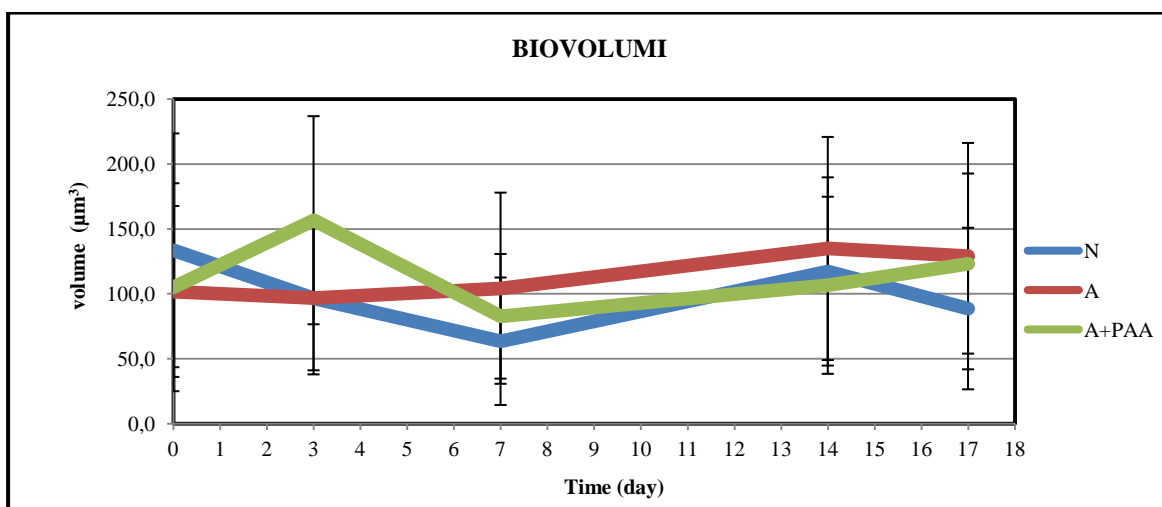


Fig. 19 Volume cellulare di *D. communis* sottoposto ai tre diversi trattamenti in funzione del tempo e valori di pH misurati nelle culture.

4.2.2 Assorbimento dei nutrienti

L'assorbimento dei nutrienti dal mezzo di coltura da parte delle cellule algali è dipendente da differenti fattori ambientali che influenzano la crescita delle stesse, come la disponibilità di luce (Janssen et al., 2000), la temperatura (Li et al., 2010), la concentrazione e la forma dei nutrienti (Hyenstrand et al., 2000). In Fig. 20 è mostrato l'uptake dei nutrienti in funzione del tempo, nelle tre diverse condizioni. La concentrazione iniziale di azoto (sia ammoniacale sia sotto forma di nitrato) e di fosforo è stata 28 mg/L e 9 mg/L rispettivamente. La concentrazione di ammonio nelle condizioni A e A_{+PAA}, permane stabile nelle prime 48 h, subendo, successivamente, un decremento continuo fino al giorno 5 per entrambe le condizioni. L'esaurimento totale del nutriente avviene al giorno 7 e al giorno 10 per i trattamenti A e A_{+PAA} rispettivamente e questo può essere dovuto all'effetto del fitormone presente nella condizione A_{+PAA}. La concentrazione di nitrati, elevata solo per la condizione N, subisce un decremento costante fino al completo esaurimento al giorno 10. L'andamento del consumo dei fosfati è simile per le tre condizioni. Il consumo risulta essere più lento rispetto alle forme azotate e la rimozione totale non avviene nemmeno alla fine dell'esperimento. Si può osservare che la condizione N consuma i fosfati in quantità inferiore rispetto ad A e A_{+PAA}. Questi risultati ci permettono di rilevare che la condizione A è il trattamento che rimuove più velocemente e in maniera più efficace l'azoto presente nel mezzo e che la presenza di un fitormone nella condizione A_{+PAA} non sembra aver avuto effetti rilevanti sull'assorbimento dei nutrienti da parte di *D. communis*. Il mantenimento del pH a valori costanti nei tre diversi trattamenti ha impedito l'acidificazione delle colture contenenti ammonio che avrebbe potuto portare ad un effetto limitante della crescita (Li et al., 2010).

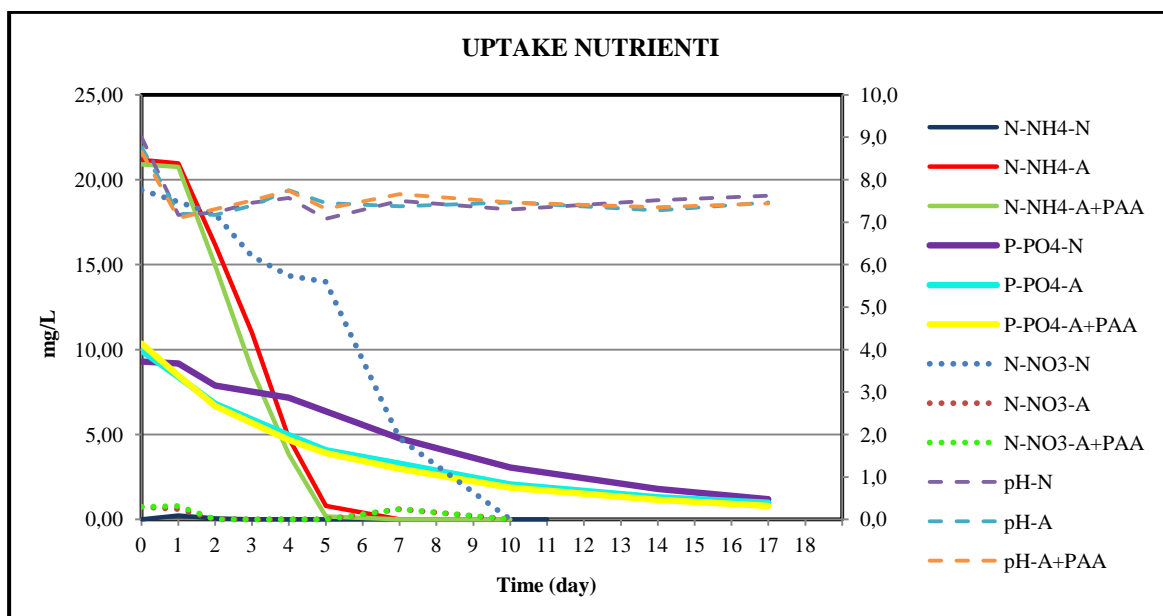


Fig. 20 Assorbimento dei nutrienti da parte delle colture algali di *D. communis* sottoposte alle tre diverse condizioni in funzione del tempo e valori di pH misurati nelle colture.

4.2.3 Efficienza fotosintetica

Lo stato fisiologico delle colture alle tre diverse condizioni è stato altresì valutato misurando l'efficienza fotosintetica in relazione allo stato nutrizionale delle stesse. Lo stress indotto dalla carenza di nutrienti nelle microalghe è normalmente rilevabile da un decremento del rendimento quantico massimo (F_v/F_m); sotto limitazione da azoto, l'efficienza del PSII cala, mentre in condizioni non limitanti il valore (F_v/F_m) è nel range tra 0,6 - 0,7 (Kromkamp et al., 1999). Nel trattamento N (Fig. 21), l'efficienza del PSII aumenta leggermente nei primi due giorni, rimane stabile fino al giorno 14, subendo un lieve calo al giorno 17. La condizione A ha inizialmente un andamento simile al trattamento N fino al giorno 10; dal giorno 10 al giorno 14 questo subisce un calo importante, tornando ad aumentare alla fine dell'esperimento, eguagliando i valori misurati nel trattamento N. La condizione A+PAA ha un andamento meno lineare rispetto ad N ed A; il suo rendimento quantico massimo è in calo già dal giorno 10. I valori della resa quantica massima sono inferiori a 0,6 ed è plausibile supporre una limitazione da nutrienti; in particolare, la limitazione è operata dall'azoto, considerato il basso valore dei rapporti N/P cellulari (Fig. 24).

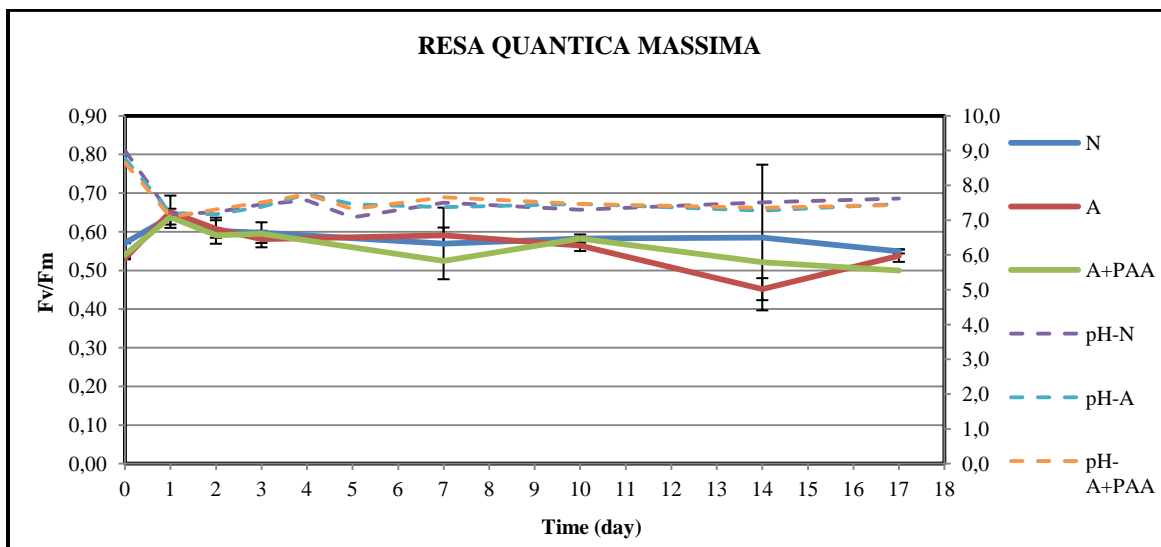


Fig. 21 Rendimento quantico massimo delle colture algali di *D. communis* sottoposte alle tre diverse condizioni in funzione del tempo e valori di pH misurati nelle colture.

Il rendimento quantico effettivo del trattamento N ha un andamento similare al suo rendimento quantico massimo; dal giorno 10 dell'esperimento subisce un lieve calo costante fino al giorno 17. $(F_m' - F_t)/F_m'$ di A come per la condizione N, subisce un calo costante fino alla fine dell'esperimento. Il rendimento quantico effettivo della condizione A+PAA ha un andamento irregolare fino al giorno 7; successivamente subisce un importante decremento al decimo giorno, calando costantemente fino al giorno 17 (**Fig.22**).

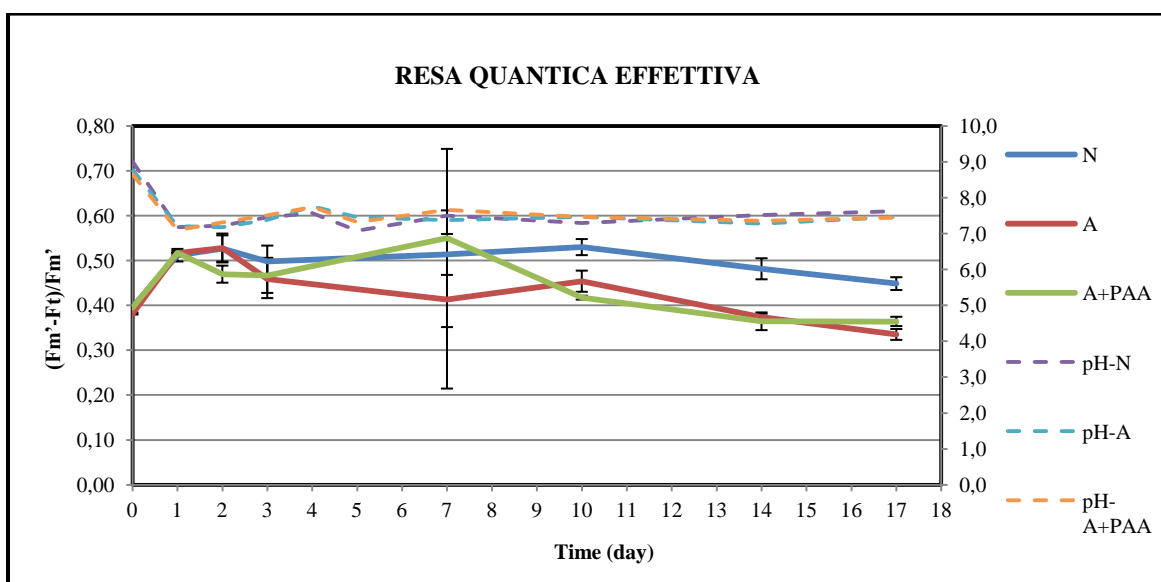


Fig. 22 Rendimento quantico effettiva delle colture algali di *D. communis* sottoposte alle tre diverse condizioni in funzione del tempo e valori di pH misurati nelle colture.

L'efficienza fotosintetica della condizione N è la più alta delle tre condizioni soprattutto nella fase finale dell'esperimento, indicazione di un buon stato fisiologico delle cellule della coltura, rappresentato anche dall'incremento della biomassa (**Fig. 18**). L'efficienza fotosintetica di A_{+PAA} è simile all'efficienza della condizione A e questo suggerisce che la presenza del fitormone non abbia avuto effetti migliorativi sull'attività fotosintetica delle cellule della coltura. Al termine dell'esperimento il rendimento quantico delle tre condizioni cala con velocità differenti e questo potrebbe essere attribuibile al diverso periodo di esaurimento dei nutrienti.

4.2.4 Composizione molecolare

La composizione molecolare che caratterizza i tre trattamenti rispetto alla beuta madre, ha come percentuale di carbonio un quantitativo simile (**Fig. 23**). Il contenuto di azoto risulta essere maggiore nel trattamento N rispetto ad A e A_{+PAA}, mentre A ha il quantitativo inferiore rispetto a tutti i trattamenti. Al contrario, N ha la percentuale di fosforo inferiore a tutte le condizioni, mentre A ne ha il quantitativo maggiore. Date le analogie nella composizione molecolare tra i trattamenti A e A_{+PAA} è possibile supporre che l'effetto dell'acido fenilacetico del trattamento A_{+PAA}, non abbia portato a variazioni evidenti sulla composizione molecolare delle cellule.

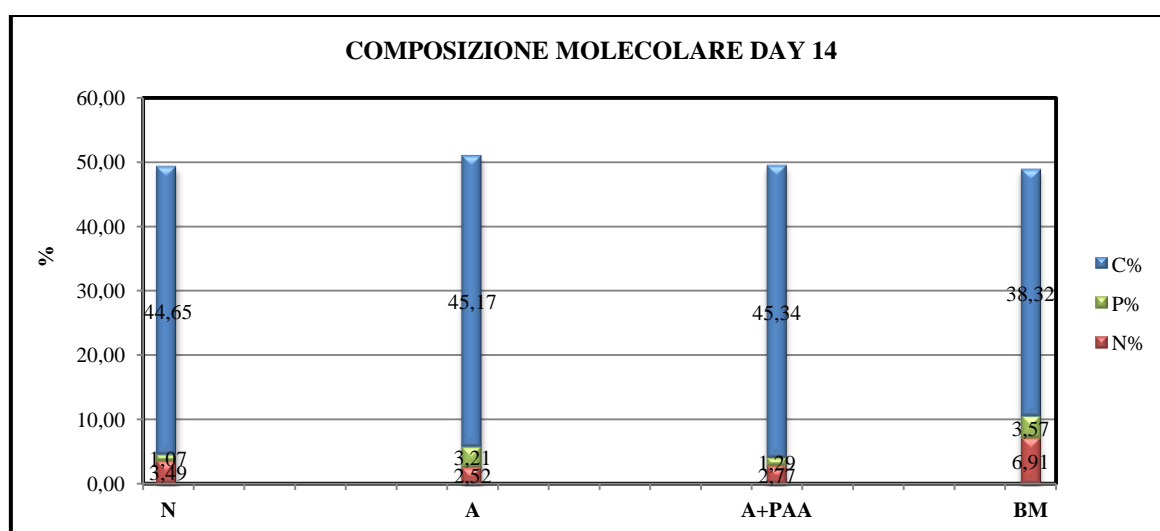


Fig. 23 Percentuale di carbonio, fosforo e azoto delle cellule delle colture algali di *D. communis* sottoposte alle tre diverse condizioni nell'ultimo giorno di esperimento.

La Fig. 24 mostra i rapporti N/P, C/P e C/N dei tre diversi trattamenti rispetto alla beuta madre. La condizione N mostra il rapporto N/P maggiore (3:1) rispetto alle altre condizioni determinato dalle diverse concentrazioni di N/P misurate. Le condizioni A e A+PAA risultano confrontabili. Secondo il classico rapporto di Redfield, per cui il rapporto tra atomi di azoto e atomi di fosforo in condizioni ottimali debba essere considerato pari a 16:1, i rapporti ottenuti con le analisi di questo studio, dovrebbero alterare la capacità di rimozione dei nutrienti dal mezzo da parte dei tre trattamenti, evento che non è stato riscontrato. Diversi studi mostrano come *Scenedesmus obliquus* sia in grado di adattarsi a basse concentrazioni di fosforo e alte di azoto (Celekli et al., 2008). Di fatto questo studio conferma come *D.communis* rimuova completamente i nutrienti con qualsiasi rapporto N/P, contrariamente a quanto ottenuto da Li et al. (2010).

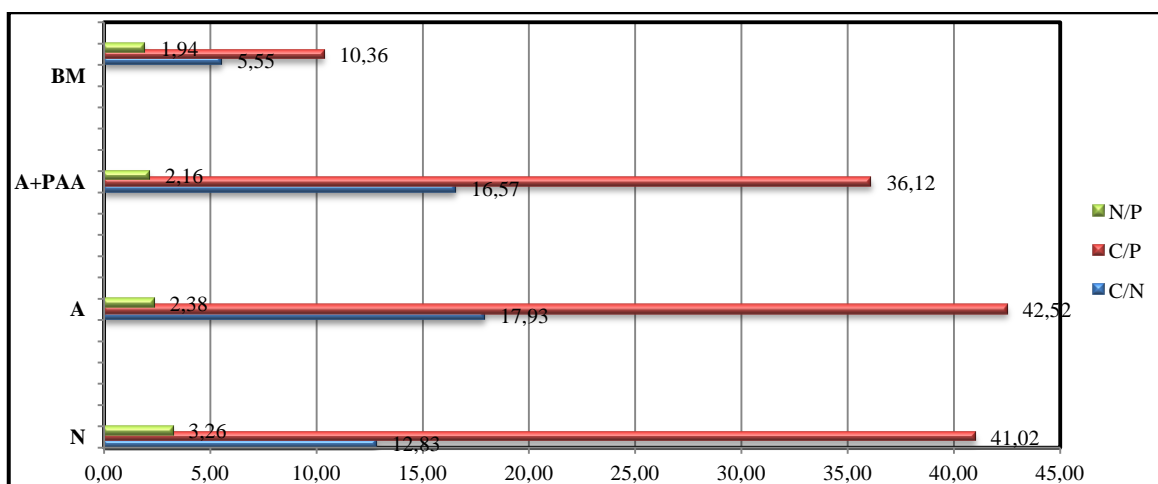


Fig. 24 Rapporti atomici tra carbonio, fosforo e azoto delle cellule delle colture algali di *D. communis* sottoposte alle tre diverse condizioni nell'ultimo giorno di esperimento.

4.2.5 Contenuto cellulare

Il contenuto cellulare delle colture sottoposte ai tre diversi trattamenti è rappresentato in Fig. 25. Il contenuto di polisaccaridi è simile per tutte le condizioni. Il contenuto proteico è maggiore nel trattamento con nitrati e questo è dovuto all'elevato contenuto di azoto (Fig. 23) incorporato come proteine nelle cellule della coltura. La deplezione di azoto in diversi momenti della crescita, la temperatura stabile di 25 °C e l'illuminazione costante, possono aver contribuito ad influenzare l'accumulo di polisaccaridi, proteine e lipidi nelle cellule dei tre diversi trattamenti (Ho et al., 2011, Xin et al., 2011). Il parametro che varia maggiormente è la percentuale di lipidi: nella condizione con nitrati corrisponde a più della

metà della biomassa cellulare (56,59 %), rispetto al 36,34 % del trattamento con ammonio e al 36,70 % del trattamento con ammonio e fitormone. L'elevato contenuto di lipidi della condizione con nitrati dovrebbe essere giustificato da un alto rapporto C/N (**Fig. 24**), più elevato rispetto alle condizioni con ammonio, evento che non si verifica. Questo risultato è contrario a quanto ottenuto da Lin Q. e Lin J. (2011) e merita un maggior approfondimento. Le analogie del contenuto cellulare delle condizioni A e A_{+PAA}, fanno supporre una scarsa influenza dell'ormone utilizzato sulla composizione cellulare.

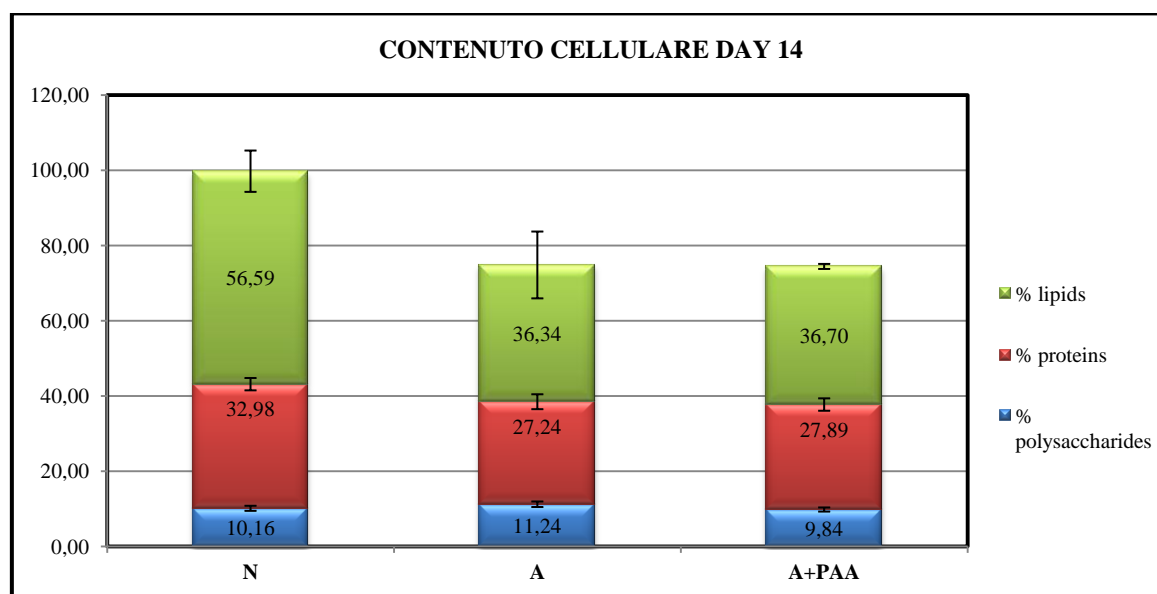


Fig. 25 Composizione biochimica delle cellule delle colture algali di *D. communis* sottoposte alle tre diverse condizioni nell'ultimo giorno di esperimento.

4.2.6 Conclusioni

Questo esperimento mostra come l'incremento della biomassa di *Desmodesmus communis* avvenga positivamente sia in un terreno arricchito con nitrati sia in terreno con ammonio, anche se quest'ultimo risulta essere più tossico (Garcia et al., 2006) e determini una crescita minore. Contrariamente a quanto ottenuto con altri studi, il trattamento con maggior contenuto lipidico è risultata essere la condizione N, che mostra inoltre, un contenuto proteico maggiore rispetto agli altri trattamenti per merito dell'alto rapporto N/P. Il trattamento A_{+PAA} contenente l'ormone, non ha mostrato variazioni evidenti sulla crescita e sulla composizione molecolare rispetto alle colture cresciute in sua assenza, sia nel caso in cui la fonte di azoto fosse l'ammonio sia il nitrato; questo permette di supporre che l'effetto ormonale sia stato irrilevante.

4.3 Esperimento in fotobioreattore

Questo esperimento ha previsto l'utilizzo di due fotobioreattori anulari, la cui fonte di azoto (ammonio) e la concentrazione di nutrienti (28 mg/L per l'azoto e 9 mg/L per il fosforo) è stata la medesima. Ad un fotobioreattore ($\text{PBR}_{+\text{PAA}}$) è stato altresì aggiunto l'ormone acido fenilacetico (15 mg/L) ed il suo effetto, in termini di crescita, risposte fisiologiche e composizione finale della biomassa, è stato confrontato con il fotobioreattore di controllo ($\text{PBR}_{-\text{CONTROLLO}}$).

4.3.1. Valutazione della biomassa algale

In Fig. 26 è mostrato l'accrescimento della biomassa algale prelevata dai due fotobioreattori nel corso dell'esperimento, in parallelo con le misure di pH delle colture in oggetto. In generale si osserva un trend positivo di crescita da parte di entrambe le condizioni, anche se l'aumento di biomassa di $\text{PBR}_{+\text{PAA}}$ è leggermente superiore a $\text{PBR}_{-\text{CONTROLLO}}$, ma solo fino al giorno 46 dell'esperimento: dopo l'ultima aggiunta di nutrienti, è osservabile una riduzione della crescita da parte di $\text{PBR}_{+\text{PAA}}$ rispetto a $\text{PBR}_{-\text{CONTROLLO}}$. Questo può far supporre che l'ormone presente in $\text{PBR}_{+\text{PAA}}$ non sia stato efficace. La riduzione del pH da parte di $\text{PBR}_{+\text{PAA}}$ può aver favorito questa riduzione.

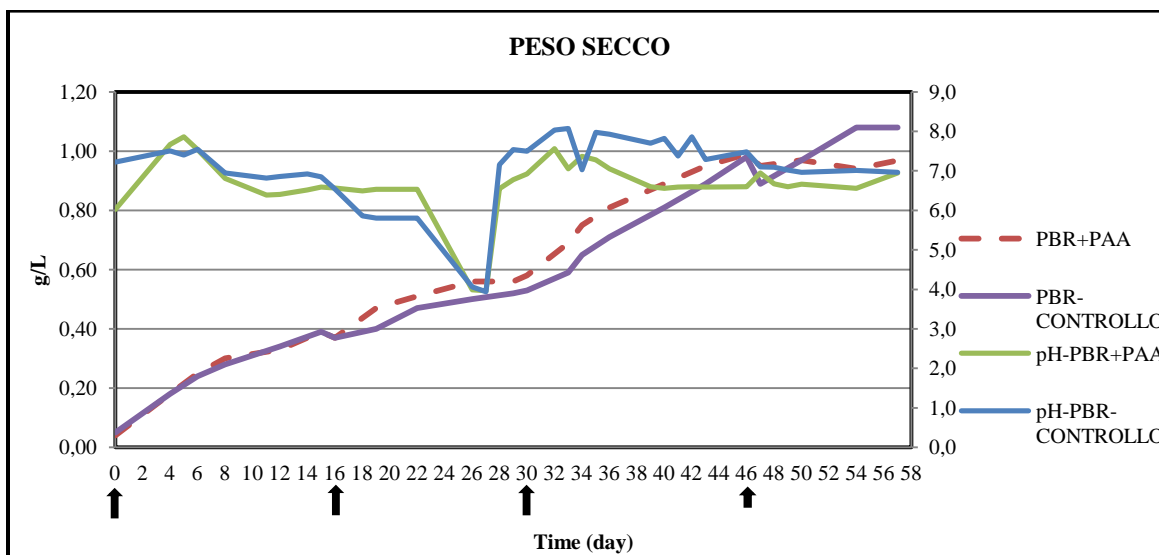


Fig. 26 Densità cellulare delle colture algali di *D. communis* all'interno dei due fotobioreattori in funzione del tempo e valori di pH misurati all'interno del sistema stesso. Le frecce sottostanti il giorno 0, 16, 30, 46 indicano l'aggiunta di nutrienti e dell'ormone in $\text{PBR}_{+\text{PAA}}$ e dei nutrienti in $\text{PBR}_{-\text{CONTROLLO}}$.

4.3.2 Assimilazione dei nutrienti

L'assorbimento dei nutrienti da parte delle colture nei due fotobioreattori è mostrato in Fig. 27. L'andamento dell'uptake di azoto e fosforo da parte di PBR_{+PAA} e di PBR⁻CONTROLLO risulta essere simile nel corso dell'esperimento e corrisponde ad un andamento atteso in un sistema semi-continuo: i nutrienti sono aggiunti all'inizio dell'esperimento, vengono consumati fino ad esaurimento ogni 15 giorni e la loro rimozione corrisponde ad un incremento della biomassa algale. Dal giorno 46 l'assorbimento di azoto e fosforo si differenzia per i due sistemi. L'ammonio è assorbito più lentamente da parte di PBR_{+PAA}, che non lo esaurisce totalmente alla fine dell'esperimento. Questo spiegherebbe la crescita inferiore di PBR_{+PAA} rispetto a PBR⁻CONTROLLO. Al contrario l'assorbimento del fosforo da parte di PBR_{+PAA} avviene fino al totale esaurimento alla fine dell'esperimento. Il PBR⁻CONTROLLO consuma l'ammonio più velocemente fino a totale esaurimento già 48 h dopo. Al contrario di PBR_{+PAA}, il fosforo è consumato più lentamente da PBR⁻CONTROLLO con un calo costante, senza che questo venga esaurito totalmente al giorno 57. La variabilità del pH e la presenza dell'ormone in PBR_{+PAA} non sembrano incidere sulla rimozione dei nutrienti dal mezzo da parte delle colture dei due fotobioreattori.

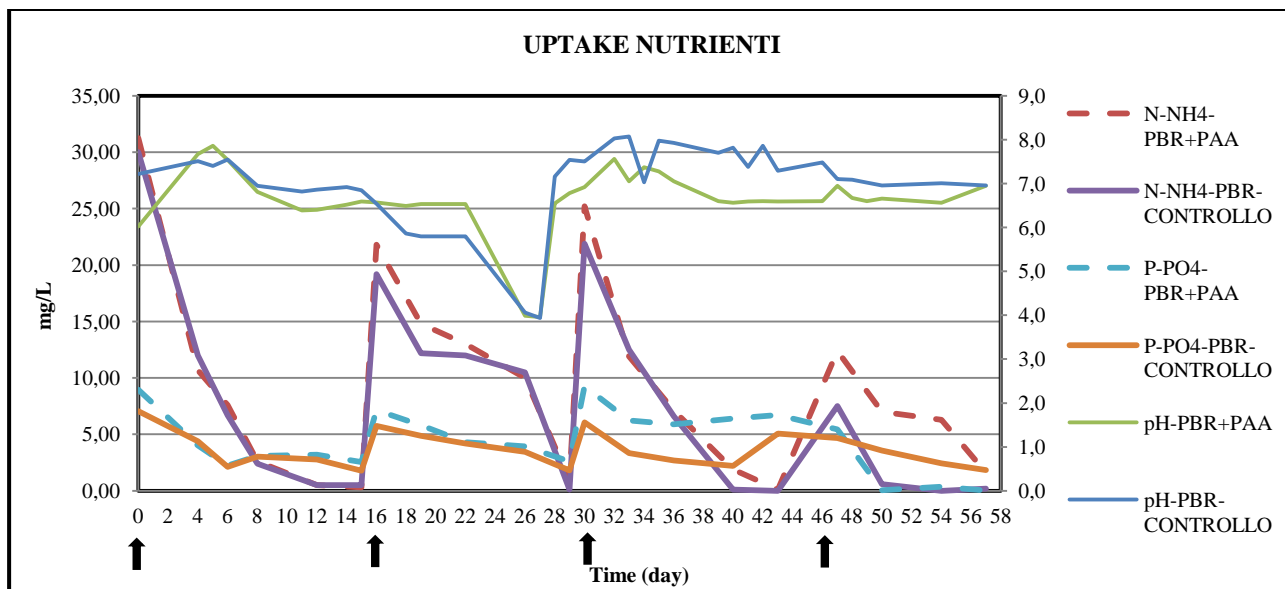


Fig. 27 Assimilazione di azoto e fosforo da parte di *D. communis* all'interno dei due fotobioreattori in funzione del tempo e valori di pH misurati all'interno del sistema stesso. Le frecce sottostanti il giorno 0, 16, 30 e 46 indicano l'aggiunta di nutrienti e dell'ormone in PBR_{+PAA} e dei nutrienti in PBR⁻CONTROLLO.

4.3.3 Efficienza fotosintetica

L'efficienza fotosintetica delle colture dei due fotobioreattori è mostrata in Fig. 28. Il rendimento quantico massimo ed effettivo risulta essere inferiore in PBR_{+PAA} rispetto a PBR_{-CONTROLLO}, che può essere ascrivibile alla crescita inferiore di PBR_{+PAA}. L'aggiunta e l'esaurimento di nutrienti e le variazioni di pH potrebbero aver influenzato l'attività fotosintetica delle cellule. Le migliori prestazioni dell'apparato fotosintetico di PBR_{-CONTROLLO} si riflettono su un aumento della biomassa algale alla fine dell'esperimento. L'effetto dello stimolante biochimico utilizzato non è evidenziabile dai dati relativi al rendimento quantico.

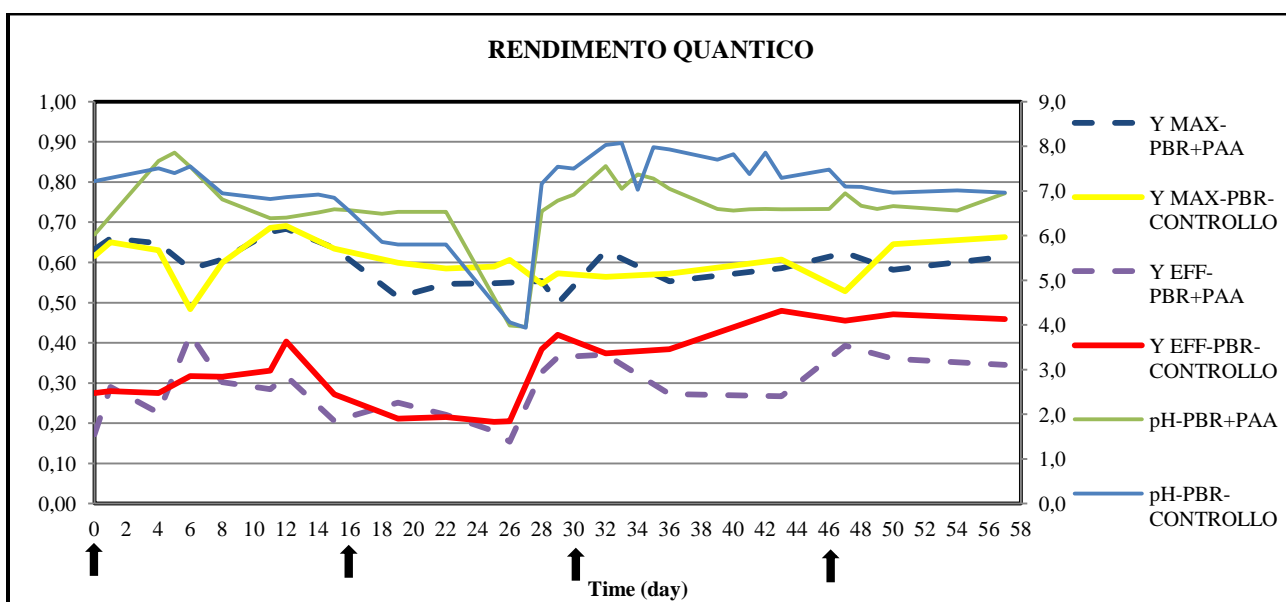


Fig. 27 Rendimento quantico di *D. communis* all'interno dei due fotobioreattori in funzione del tempo e valori di pH misurati all'interno del sistema stesso. Le curve tratteggiate corrispondono all'efficienza fotosintetica di PBR_{+PAA}. Le curve più marcate corrispondono all'efficienza fotosintetica di PBR_{-CONTROLLO}. Le frecce sottostanti il giorno 0, 16, 30 e 46 indicano l'aggiunta di nutrienti e dell'ormone in PBR_{+PAA} e dei nutrienti in PBR_{-CONTROLLO}.

4.3.4 Composizione molecolare

La composizione molecolare nell'ultimo giorno di aggiunta dei nutrienti (giorno 46), è mostrata qui di seguito (**Fig. 29**). Il contenuto di carbonio, azoto e fosforo è equivalente per entrambi i fotobioreattori, che si riflette su rapporti N/P, C/P e C/N analoghi (**Fig. 30**). Le analogie nella composizione molecolare tra le colture dei due fotobioreattori consentono di supporre che la presenza dell'ormone in PBR_{+PAA} non sia qui rilevabile.

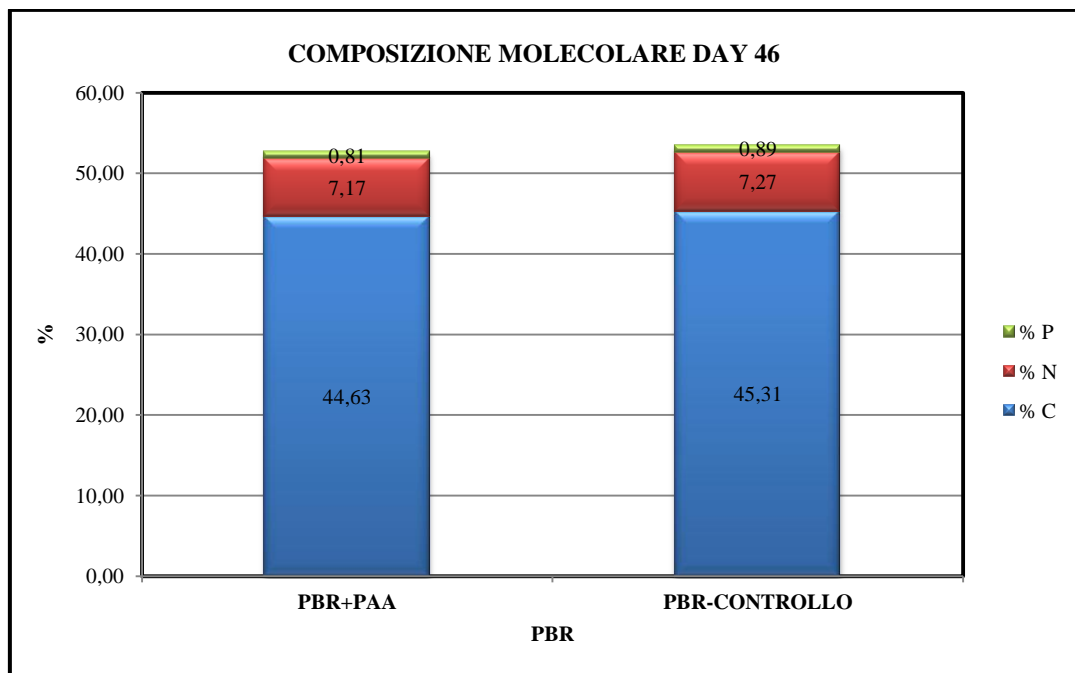


Fig. 29 Percentuale di carbonio, fosforo e azoto nelle cellule di *D. communis* all'interno dei due fotobioreattori nell'ultimo giorno di aggiunta di nutrienti.

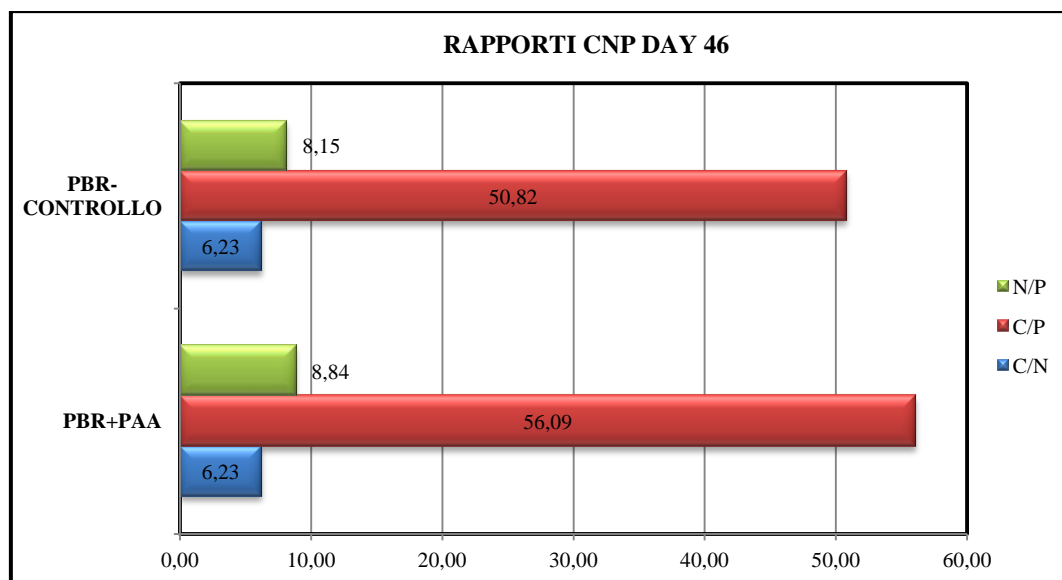


Fig. 30 Rapporti atomici tra carbonio, fosforo e azoto delle cellule di *D. communis* all'interno dei due fotobioreattori nell'ultimo giorno di aggiunta di nutrienti.

La composizione molecolare è stata misurata anche nell'ultimo giorno dell'esperimento, dopo che il consumo dei nutrienti si era differenziato (giorno 57) è simile per le colture di entrambi i fotobioreattori (**Fig. 31**). Rispetto al giorno 46 (**Fig. 29**) tuttavia si osserva un incremento del contenuto di azoto per entrambe le colture. PBR_{+PAA} subisce una

diminuzione del fosforo e un incremento del contenuto di carbonio. Nonostante l' azoto sia assorbito più velocemente da parte di PBR-CONTROLLO (**Fig. 27**), il contenuto di questo, risulta essere inferiore rispetto a PBR_{+PAA}. PBR-CONTROLLO mostra un incremento generale di carbonio, azoto e fosforo ed è possibile che questo incremento sia correlato ad un aumento della biomassa (**Fig. 26**). I diversi rapporti N/P, C/P, C/N mettono in evidenza le differenze nella composizione molecolare tra PBR_{+PAA} e PBR-CONTROLLO al giorno 46 e al giorno 57 (**Fig. 32**). Dal giorno 46 al giorno 57, il rapporto N/P di PBR_{+PAA} aumenta notevolmente (da N/P di 9:1 del giorno 46 a N/P di 14:1 del giorno 57), superando notevolmente il rapporto N/P di PBR-CONTROLLO, in accordo con Voltolina et al. (1998) che dimostra come il rapporto maggiormente bilanciato per *Scenedesmus* spp. sia 16:1. L'aumento della percentuale di carbonio in PBR_{+PAA} e la contemporanea riduzione della percentuale di fosforo, portano PBR_{+PAA} ad avere un elevatissimo rapporto C/P, decisamente maggiore rispetto allo stesso rapporto di PBR-CONTROLLO (76,79 C/P di PBR_{+PAA} rispetto a 34,83 C/P di PBR-CONTROLLO).

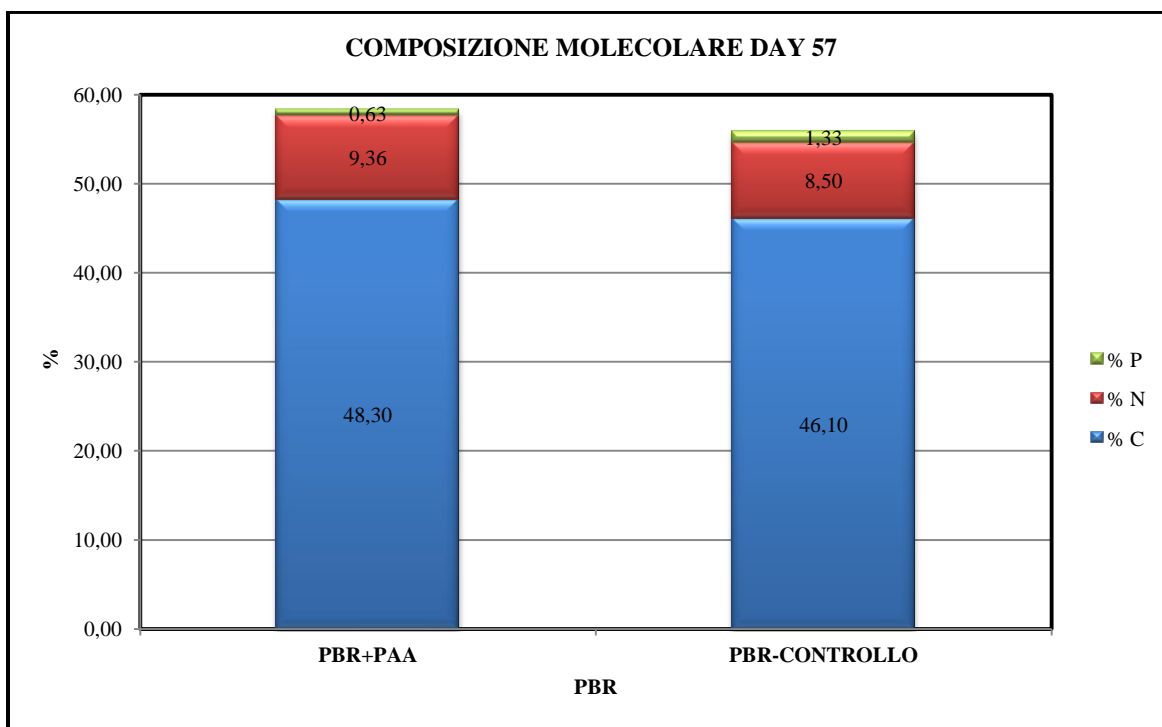


Fig. 31 Percentuale di carbonio, fosforo e azoto nelle cellule di *D. communis* all'interno dei due fotobioreattori nell'ultimo giorno di esperimento.

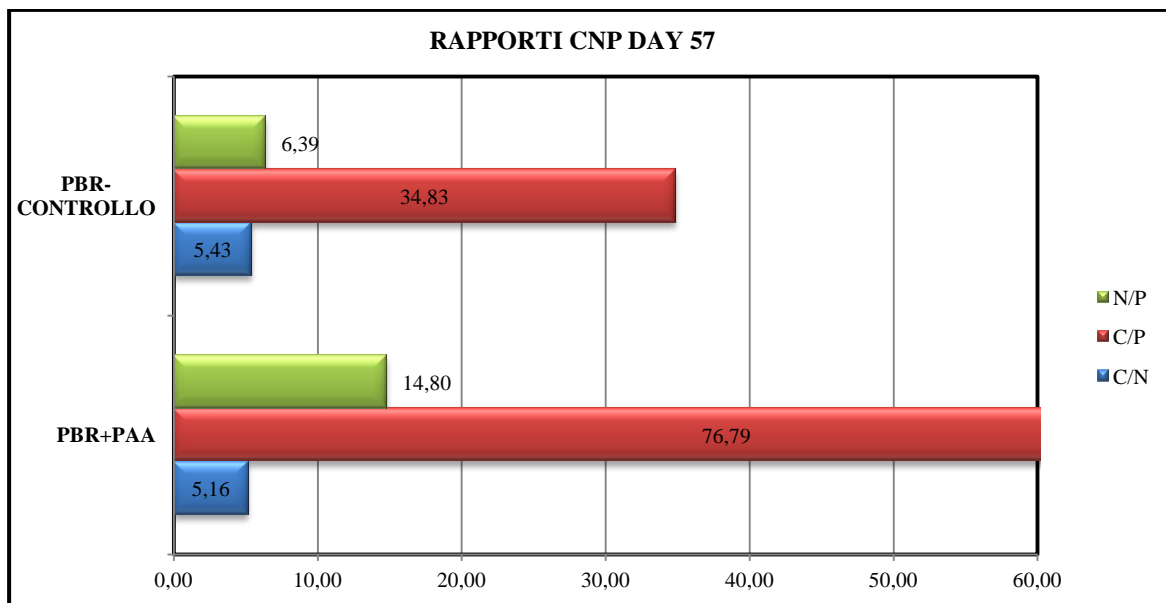


Fig. 32 Rapporti atomici tra carbonio, fosforo e azoto delle cellule di *D. communis* all'interno dei due fotobioreattori nell'ultimo giorno di esperimento.

4.3.5 Contenuto cellulare

In Fig. 33 è mostrato il contenuto cellulare di PBR_{+PAA} e PBR_{-CONTROLLO} al giorno 46. In questo senso la biomassa prodotta nei due fotobioreattori mostrano elevate similitudini. L'elevato contenuto di polisaccaridi può essere attribuibile all'elevato contenuto di carbonio all'interno delle cellule.

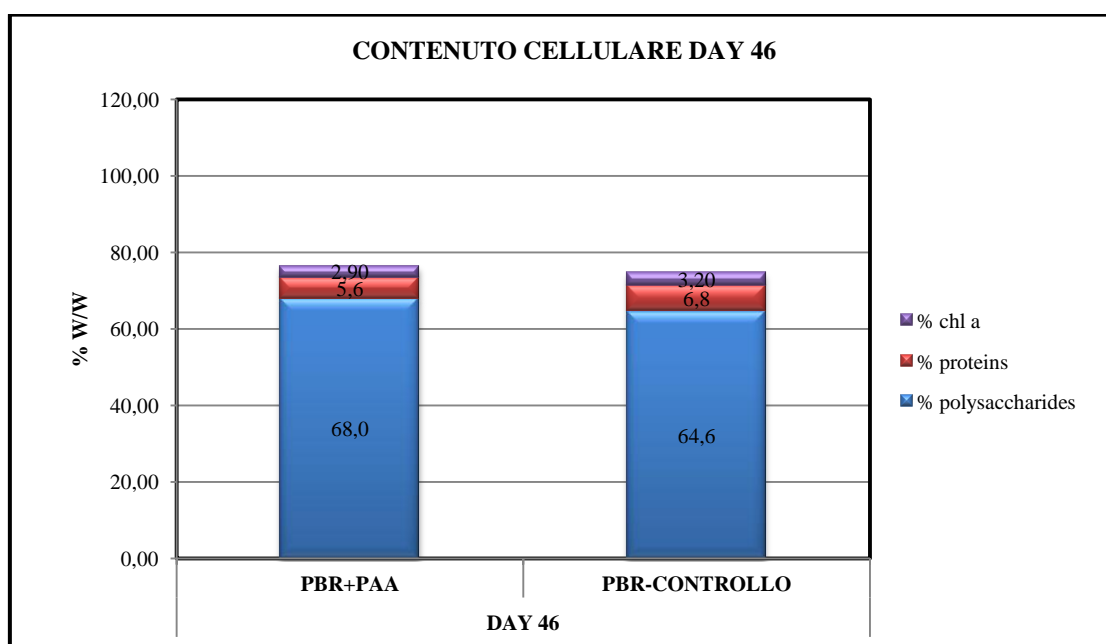


Fig. 33 Composizione biochimica delle cellule di *D. communis* all'interno dei due fotobioreattori nell'ultimo giorno di aggiunta dei nutrienti.

Rispetto al giorno 46 (**Fig. 33**), sono visibili differenti variazioni nel contenuto cellulare delle colture dei due fotobioreattori (**Fig. 34**). La percentuale di polisaccaridi di PBR_{+PAA} ha subito un importante decremento, mentre il contenuto di proteine e di clorofilla, ha subito un aumento, risultato atteso dato l'elevato contenuto di azoto (**fig. 31**). Il contenuto lipidico è pari al 25 % della biomassa, che rientra nel range riportato dalla **Tabella 3** per *Scenedesmus* spp. L'unico valore che registra un accrescimento in PBR_{-CONTROLLO}, è la percentuale di proteine presente. Il contenuto lipidico risulta invece essere maggiore rispetto a PBR_{+PAA}. Quest'ultimo ha un contenuto maggiore di composti azotati (proteine e clorofilla), verificabile dalla percentuale di azoto incorporata e dal suo rapporto N/P. Per contro PBR_{+PAA} ha un contenuto inferiore di lipidi rispetto a PBR_{-CONTROLLO}; questo suggerisce come l'effetto dell'ormone non sia stato rilevante sul contenuto cellulare. La percentuale lipidica ottenuta da quest'esperimento è in accordo con quanto ottenuto da Widjaja et al., (2009) utilizzando colture algali monospecifiche.

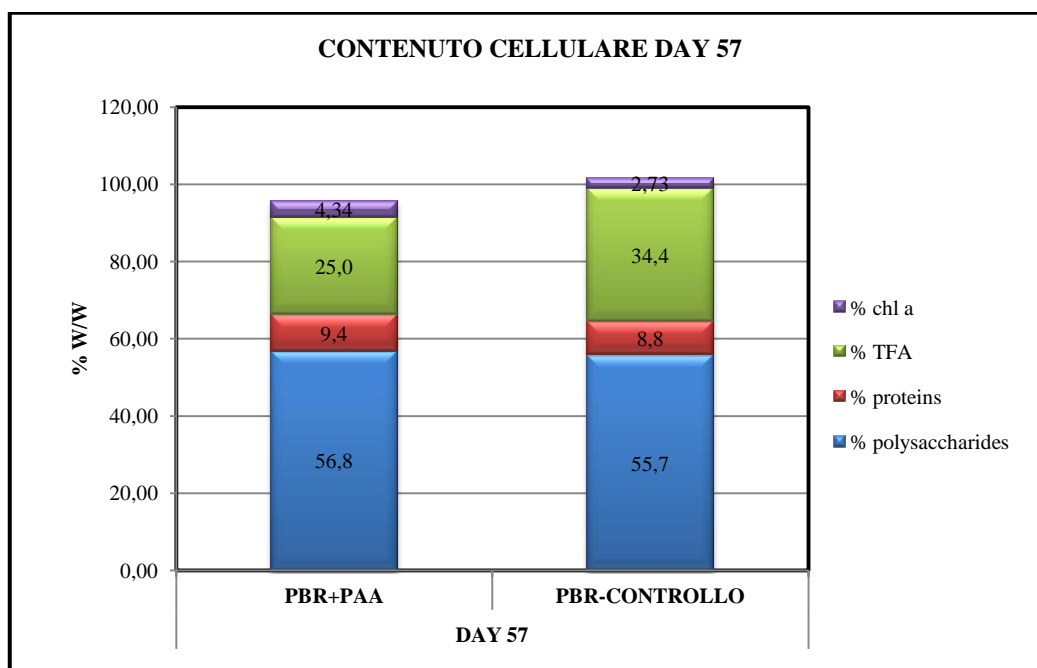


Fig. 34 Composizione biochimica delle cellule di *D. communis* all'interno dei due fotobioreattori nell'ultimo giorno di esperimento.

4.3.6 Conclusioni

I risultati di questo esperimento indicano come la presenza del fitormone PAA in PBR_{+PAA} non abbia avuto efficacia sull'incremento della crescita e sulla variazione del contenuto cellulare rispetto alla coltura pura di PBR-CONTROLLO. Questo è dimostrato dal buono stato fisiologico generale della biomassa algale di PBR-CONTROLLO in termini di peso secco, assorbimento dei nutrienti ed efficienza fotosintetica. Il maggior contenuto cellulare di composti azotati, quali proteine e clorofilla di PBR_{+PAA} rispetto a PBR-CONTROLLO, permettono di ipotizzare un possibile effetto da parte del fitormone in favore dell'accumulo di questi. E' altresì possibile che l'azione dello stimolante biochimico abbia sfavorito l'accumulo di composti lipidici come è osservabile in Fig. 33: la percentuale lipidica di PBR_{+PAA} è nettamente inferiore rispetto alla percentuale di PBR-CONTROLLO (25% di PBR_{+PAA} rispetto a 34,4 % di PBR-CONTROLLO) e questo permette di supporre, in un'ottica di produzione di biocarburanti su larga scala, che per una maggiore resa lipidica, non sia necessario l'utilizzo di questa tipologia di fitormone.

4.4 Conclusioni generali

I risultati ottenuti da questo studio confermano la plasticità adattativa di *Desmodesmus communis* e la sua abilità ad adeguarsi a condizioni di elevate concentrazioni di ammonio e limitazione da nutrienti. Questo si riflette sulla sua capacità di crescere ed incrementare la propria biomassa a qualsiasi rapporto N/P, in disaccordo con quanto osservato da Li et al. (2010). In termini di crescita e composizione molecolare sono favorite le condizioni arricchite con nitrati, diversamente da quanto ottenuto da Lin Q. e Lin J. (2011), e le colture allestite con ammonio (condizione A e PBR-CONTROLLO); queste differenze possono essere anche dovute alla diversa durata degli esperimenti e ai differenti metodi di coltivazione (esperimento con colture batch e sistema semi-continuo per i fotobioreattori). Il maggior contenuto di composti polisaccaridici e proteici delle condizioni in cui era presente il fitormone rispetto al contenuto lipidico, porta a supporre un possibile utilizzo di questa biomassa algale come biocarburanti, attraverso un processo di fermentazione anaerobica piuttosto di un processo di estrazione lipidica, meno conveniente dal punto di vista economico e produttivo. In questo studio è possibile ipotizzare che lo stimolante biochimico utilizzato abbia avuto scarso effetto, considerando i dati relativi alla biomassa e contenuto cellulare; in particolare l'esperimento in fotobioreattore ha dimostrato che non è necessario aggiungerlo più volte nel corso della crescita della coltura. Nonostante questo esito negativo è comunque ipotizzabile, attraverso lo screening preliminare, la possibilità che i fitormoni possano agire sulle fasi di crescita algale, riducendo la fase lag e prolungando la fase esponenziale favorendo un incremento della biomassa algale. Quanto ottenuto è comunque da considerarsi un utile contributo al progresso della tecnologia per gli impieghi di biocarburanti derivanti dalle microalghe. La classe e la concentrazione prescelta del fitormone utilizzato è da considerarsi in combinazione con diversi parametri specifici per la specie in oggetto, quali l'intensità luminosa ($100-120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ per le colture batch e $300-350 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ per i fotobioreattori), la temperatura ($\pm 25^\circ\text{C}$), terreni di coltura con fonti di azoto differenti (nitrati ed ammonio), supplemento di CO_2 (al 2 %), sistemi di coltivazione differenti. Questo suggerisce che la risposta fisiologica della biomassa algale può essere differente in funzione di quanto appena enunciato. Ulteriori studi si renderanno necessari per poter effettuare confronti in termini di produttività in diverse condizioni ambientali, per determinare quale stimolante o miscela di stimolanti biochimici utilizzare, ottimizzando i dosaggi per migliorare la produzione di biomassa

algale, sia essa di acqua dolce o di acqua marina. Una comprovata efficacia su larga scala di queste tecnologie potrà avere applicazioni più ampie nell'ambito del trattamento di acque reflue e nella produzione di bioenergia e biocarburanti del prossimo futuro.

5. Bibliografia

Abeles, F. B., 1973. *Ethylene in Plant Biology*. Academic Press, Inc., New York, p. 147.

Alabi, A.O., Tampier, M., Bibeau, E., 2009. Microalgae technologies & processes for biofuels/bioenergy production in British Columbia: current technology, suitability and barriers to implementation. Final report to the British Columbia Innovation Council, Seed Science.

Aoyama, K., Uemura, I., Miyake, J., and Asada, Y., 1987. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Journal of Fermentation Bioengineering* 83, 17.

Arnold, T.M., Targett, N.M., Tanner, C.E., Hatch, W.I., and Ferrari, K.E., 2001. Evidence for Methyl Jasmonate-Induced Phlorotannin Production in *Fucus vesiculosus* (*Phaeophyceae*). *Journal of Phycology* 37, 1026–1029.

Baba, M., Kikuta, F., Suzuki, I., Watanabe, M.M., Shiraiwa, Y., 2012b. Wavelength Specificity of Growth, Photosynthesis, and Hydrocarbon Production in the Oil-producing Green Alga *Botryococcus braunii*. *Journal of Bioresource Technology* 109, 266–270.

Bajguz, A. and Tretyn, A., 2003. The Chemical Characteristic and Distribution of Brassinosteroids in Plants. *Phytochemistry* 62, 1027–1046.

Barnwal, B., & Sharma, M., 2005. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 9, 363–378.

Barbato, F., 2009. Tecniche di coltura di microalghe, Enea.

Barbato, F., 2011. An integrated approach to microalgae culture in Italy. IEA meeting on Biorefinery, Task 42, Tortona -Italy, 4 aprile 2011. <http://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/publications/stakeholder/meetings/2011/>

Oswald, W.J., Golueke, C.G., 1960. *Biological transformation of solar energy*. Advances in Applied Microbiology 2, 223–262.

Basu, S., Sun, H., Brian, L., Quatrano, R.L., and Muday, G.K., 2002. Early Embryo Development in *Fucus distichus*. In Auxin Sensitive Plant Physiology 130, 292–302.

Becker, W., 2004. Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Handbook of Microalgal Aquaculture: Biotechnology and Applied Phycology. Ed. A. Richmond-Blackwell Science 380–391.

Becker, E. W., 2007. Micro-algae as a source of protein. Journal of Biotechnology Advances 25(2), 207–210.

Bica, A., Barbu-Tudoran, L., Drugă, B., Coman, C., Nicoară, Ana., Szöke-Nagy, T., Dragoș, N., 2012. *Desmodesmus communis* (Chlorophyta) from romanian freshwaters: coenobial morphology and molecular taxonomy based on the ITS2 of new isolates. Analele Societatii Nationale de Biologie Celulara 17 (1), 16–28.

Bisalputra, T., Weier, T. E., Risley, E. B., Engelbrecht, A. H. P., 1964. The pectic layer of the cell wall of *Scenedesmus quadricauda*. American Journal of Botany 51, 548–551.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37, 911–917.

Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology 70, 313–321.

Brannon, M., and Bartsch A. 1939. Influence of growth substances on growth and cell division in green algae. American Journal of Botany 26, 271–279.

Bratbak, G., 1985. Bacterial biovolume and biomass estimations. Journals of Applied and Enviromental Microbiology 49, 1488–1493.

Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 557–577.

Broecker, W.S., Peng, T.H., Beng Z., 1982. Racers in the sea. Lamont-Doherty Geological Observatory, Columbia University.

Brown, M. L., and Zeiler, K. G., 1993. Aquatic Biomass and Carbon Dioxide Trapping. *Journal of Energy Conversion Management* 34 (9-11), 1005–1013.

Celekli, A., Balci, M., Bozkurt, H., 2008. Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model. *Bioresource Technology* 99, 8742 e 8747.

Chapman, R. W, Vance, D. B., 1976. Ethephon (2- Chloroethylphosphonic acid) Effects on *Scenedesmus quadricauda* (*Chlorophyceae*). *Journal of Phycology* 12 (2), 146–149.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Journal of Biotechnology Advances* 25, 294–306.

Chisti, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology* 26, 126–131.

Conway, K., and Trainor, F. R., 1972. *Scenedesmus* morphology and floatation. *Journal of Phycology* 8, 138–143.

Cooke, T.J., Poli , D., Sztein, A.E., and Cohen, J.D., 2002. Evolutionary Patterns in Auxin Action. *Journal of Plant Molecular Biology* 49, 319–338.

Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., Carvalho, J.C.M., Sato, S., 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Journal of Biomass Bioenergy* 23, 261–269.

Davis, P.J., 2004. *Plant Hormones Kluwer*. Ed. Dordrecht.

De Marco, O., Paiano, A., Gallucci, T., 2006. “La CO₂ da gas-serra a risorsa”, *Ambiente Risorse Salute* 107, 13–18.

Demirbas, A., 2011. Production of Biodiesel from Algae Oils, *Energy Sources, Part A* 31, 163–168.

Desbois, A.P., Caldwell, G.S., Baptie, M. & Smith, V.J., 2008. Isolation and structural characterization of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 755–764.

Di Termini, I., Prassone, A., Cattaneo, C., Rovatti, M., 2011. On the nitrogen and phosphorus removal in algal photobioreactors. *Journal of Ecological Engineering* 37, 976–980.

Dring, M.J., 1974. Reproduction. In, *Algal Physiology and Biochemistry*, edited by W.D.P Stewart, Botanical Monographs, University of California Press, Berkeley and Los Angeles 10, 814–837.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28, 350–356.

Eriksen, N.T., 2008. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters* 30, 1525–1536.

Fan, J.L., Andre, C. and Xu, C.C., 2011. A chloroplast pathway for the *de novo* biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* 585, 1985–1991.

Fitzgerald, G. P., Uttormark, P.D., 1974. *Applications of Growth and Sorption Algal Assays*. Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency 660/3-73-023, Washington, D.C. 20460.

Garcia, J., Green, B., Oswald, W., 2006. Long term diurnal variations in contaminant removal in high rate ponds treating urban wastewater. *Bioresource Technology* 97, 1709–1715.

García-Jiménez P., Rodrigo, M., and Robaina, R.R., 1998. Influence of Plant Growth Regulators, Polyamines and Glycerol Interaction on Growth and Morphogenesis of Carposporelings of *Grateloupia doryphora* Cultured In Vitro. *Journal of Applied Phycology* 10, 95–100.

Gelin, F., Boogers, I., Noordeloos, A.A.M., Sinninghe, Damsté J.S., Riegman, R., Leeuw, J.W., 1997. Resistant biomacromolecules in marine microalgae of the classes *Eustigmatophyceae* and *Chlorophyceae*: Geochemical applications. *Organic Geochemistry Principles and Applications* 26, 659–675.

Gilbert, R. and Perl A., 2008. *Transport revolutions. Moving people and freight without oil*, London: Earthscan.

Giordano, M., Beardall, J., Raven, J. A., 2005. CO₂ Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. *Annual Review of Plant Biology* 56, 99–131.

Graham, L.E., Wilcox L.W., 2000. *Introduction to the Algae*. Algae. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ, 468–469.

Grobbelaar, J.U., 2009. Factors governing algal growth in photobioreactors: the “open” versus “closed” debate. *Journal of Applied Phycology* 21, 489–492.

Guillard, R.R.L., 1973. *Division rates*. In, Stein (ed), Handbook of Phycological Methods, V. 1, Cambridge University Press, 289–312.

Gurbuz, F., Ciftci, H., Akcil, A., 2009. Biodegradation of Cyanide Containing Effluents by *Scenedesmus obliquus*.

Journal of Hazardous Materials 162, 74–79.

Guschina, I.A., Harwood, J.L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Journal of Progress in Lipid Research 45, 160–186.

Hegewald E., 1977. A new species and its relation to *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. Arch. Hydrobiol. Suppl. 51. Journal of Algological Studies 19, 142–155.

Hegewald, E., 1997. Taxonomy and phylogeny of *Scenedesmus*. Algae . The Korean Journal of Phycology 12, 235–246.

Hegewald E., 2000. New combinations in the genus *Desmodesmus* (*Chlorophyceae*, *Scenedesmaceae*). Journal of Algological Studies 96, 1–18.

Heydarizadeh, P., Poirier, I., Loizeau, D., Ulmann, L., Mimouni, V., Schoefs, B., Bertrand, M., 2013. Plastids of Marine Phytoplankton Produce Bioactive Pigments and Lipids. Journal of Marine Drugs 11(9), 3425–3471.

Hiromichi, Y., Yayoi, I., Keiko, (Doi) S., Hiroto, T., and Masahito, S., 2002. The Biological and Structural Similarity between Lunularic Acid and Absciscic Acid. Journal of BioScience, Biotechnology and Biochemistry 66, 840–846.

Ho, S.-H., Chen, W.-M., Chang, J.-S., 2010. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. Bioresource Technology.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54, 621–639.

Hunt, R.W., Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Das, K.C., 2010. Effect of Biochemical Stimulants on Biomass Productivity and Metabolite Content of the Microalga, *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Biochemistry Biotechnology* 162, 2400–2414.

Hyenstrand, P., Burkert, U., Pettersson, A., Blomqvist, P., 2000. Competition between the green alga *Scenedesmus* and the cyanobacterium *Synechococcus* under different modes of inorganic nitrogen supply. *Hydrobiologia* 435, 91–98.

Iwamoto, H., 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-major industrial species- *Chlorella*, 225–263. In Richmond, A. (ed). *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford, UK.

Janssen, M., Bresser, L.D., Baijens, T., Tramper, J., Mur, L.R., Snel, J.F.H., Wijffels, R.H., 2000. Scale-up aspects of photobioreactors: effects of mixing-induced light/dark cycles. *J. Appl. Phycol.* 12 (3–5), 225–237.

Jin, Y., Veiga, M.C., Kennes, C., 2005. Bioprocesses for the removal of nitrogen oxides from polluted air. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80, 483–494.

Kautsky, H., Hirsch, A., 1931. Neue Versuche zur Kohlensaureassimilation. *Die Naturwissenschaften* 19, 964–964.

Kirk, J.T.O., 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Second edition, Cambridge University Press.

Kobayashi, M., Hirai, N., Kurimura, Y., Ohigashi, H., and Tsuji, Y., 1997, Abscisis Acid-Dependent Algal Morphogenesis in the Unicellular Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Plant Growth Regulation* 22, 79–85.

Kobayashi, J. and Ishibashi, M., 1999. *Marine Natural Products and Marine Chemical Ecology, Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 8, *Miscellaneous Natural Products Including Marine Natural Products, Pheromones, Plant Hormones and Aspects of Ecology*, Barton, D.H.R., Nakanishi, K., and Meth-Cohn, O., Eds., Amsterdam: Elsevier, 416–634.

Kromkamp, J., Peene, J., 1999. Estimation of phytoplankton photosynthesis and nutrient limitation in the Eastern Scheldt estuary using variable fluorescence. *Aquatic Ecology* 33, 101 e 104.

Largeau, C., Casadevall, E., Berkaloff, C., Dhamelincourt, P., 1980. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 19, 1043–1051.

Li, X., Hu, H.-Y., Gan, K., Sun, Y.-X., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101, 5494–5500.

Lin, Q., Lin, J., 2011. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technology* 102, 1615–1621.

Logothetis, K., Dakanali, S., Ioannidis, N., Kotzabasis, K., 2004. The impact of high CO₂ concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines. *Journal of plant Physiology* 161, 715–724.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.

Lüring, M., 1999. *The Smell of Water: Grazer-Induced Colony Formation in Scenedesmus*. Thesis. Agricultural University of Wageningen, chapter 4, 6, 9.

Mandal, S., Mallick, N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 281–291.

Marián, F.D., García-Jiménez, P., and Robaina, R.R., 2000. Polyamines in Marine Macroalgae: Levels of Putrescine, Spermidine and Spermine in the Thalli and Changes in Their Concentration during Glycerol-Induced Cell Growth In Vitro. *Journal of Physiology Plant* 110, 530–534.

Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217–232.

Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659–668.

Mazur, H., Konop, A., Synak, R., 2001. Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *Journal of Applied Phycology* 13(1), 35–42.

Metzger, P., Largeau C., 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 6 (25), 486–96.

Mitsubishi, N., Ohnishi, M., Sekiguchi, Y., Kwon, Y.U., Chang, Y.T., Chung, S.K., Inoue, Y., Reid R.J., Yagisawa H., and Mimura, T., 2005. Phytic acid synthesis and vacuolar accumulation in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* induced by high concentration of inorganic phosphate and cations. *Journal of Plant Physiology* 138, 1607–1614.

Moellering, E.R. and Benning, C., 2010. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 9, 97–106.

- Molina Grima, E., Belarbi, E.H., Fernandez, F.G.A., Medina, A.R., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Journal of Biotechnology Advances* 20, 491–515.
- Müller, P., Li, X.P., and Niyogi, K.K., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Journal of Plant Physiology* 125, 1558–1566.
- Muller-Feuga, A., 1996. Microalgues marines. Les enjeux de la recherche. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Plouzané.
- Myklestad, S., Haug, A., 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 9, 125–136.
- Nedeva, D., Pouneva, I., Toncheva-Panova, T., 2008. Profiles of antioxidant isoenzymes in the pathosystem *Scenedesmus-Phlyctidium* after treatment with plant growth regulators. *Journal of Genetic Applied Plant Physiology, Special Issue* 34 (3-4), 361–376.
- Oswald, W.J., Golueke, C.G., 1960. *Biological transformation of solar energy*. *Advances in Applied Microbiology* 2, 223–262.
- Pan, X., Chang, F., Kang, L., Liu, Y., Li, G., Li, D., 2008. Effects of gibberellin A₃ on growth and microcystin production in *Microcystis aeruginosa* (cyanophyta). *Journal of Plant Physiology* 165, 1691—1697.
- Pickett-Heaps, J. D., and Staehelin, A. L., 1975. The Ultrastructure of *Scenedesmus* (*Chlorophyceae*). II. Cell Division and Colony Formation. *Journal of Phycology* 11, 163–85 ; 11.2, 186–202.
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E. and Godlewska-Zylkiewicz, B., 2012. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyceae*). *Plant Physiology and Biochemistry* 52, 52–65.

Provasoli, L. and Carlucci, A.F., 1974. Vitamins and Growth Regulators. Algal Physiology and Biochemistry, Stewart, W.D.P., Ed., Los Angeles: Berkeley 741–787.

Pryce, R.J., 1972. The Occurrence of Lunularic and Absciscic Acids in Plants. Phytochemistry 11, 1759–1761.

Redfield, A.C., 1958. The biological control of chemical factors in the environment. American Scientist 46, 205-221.

Ricci, M., 2010. Atlante ragionato delle fonti di energia rinnovabile e non, Bologna, ed. Muzzio.

Ritchie, R.J., 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. Journal of Photosynthesis Research 89, 27–41.

Rodolfi, L., Zitelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., 2008. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Journal of Biotechnology and Bioengineering 102, 100–112.

Roessler, P.G., 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. Journal of Phycology 26, 393–399.

Romera, E., González, F., Ballester, A., Blázquez, M. L. and Muñoz, J. A., 2008. Biosorption of Cd, Ni and Zn with mixtures of different types of algae. Journal of Environmental and Engineering Science 25(7), 999–1008.

Sacramento, A.T., García-Jiménez, P., Alcázar, R., Tiburcio, A.F., and Robaina, R.R., 2004. Influence of Polyamines on the Sporulation of *Grateloupia* (*Halymeniaceae*, *Rhodophyta*) Journal of Phycology 40, 887–894.

Samorì G., Samorì C., Guerrini F., Pistocchi R., 2013. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. Water Research (Oxford) 47(2), 791–801.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from Algae. TP-580- 24190. Report under Contract No. DE-AC36-83CH10093. Washington, D.C.: U.S. Department of Energy, National Renewable Energy Laboratory.

Sitnik, K.M., Musatenko, L.I., Vasyuk, V.A., Vedenicheva, N.P., Generalova, V.M., Martin, G.G., and Nesterova, A.N., 2003. *Gormonal'nii kompleks roslin i gribiv* (Hormonal Complex in Plants and Fungi), Kiiiv: Akademperiodika.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006a. Commercial applications of microalgae, Journal of Bioscience and Bionengineering 101, 87–96.

Stirk, W.A. and Van Staden, J., 1997. Comparison of Cytokinin-and Auxin-Like Activity in Some Commercially Used Seaweed Extracts. Journal of Applied Phycology 8, 503–508.

Suh, I.S. and Lee, C.G., 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. Journal of Biotechnology and Bioprocess Engineering 8(6), 313–321.

Sun, J., Liu, D., 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. Journal of Plankton Research 25, 1331–1346.

Tamiya, H., 1957. Mass culture of algae. Annual Review of Plant Physiology 8, 309.

Tarakhovskaya, E.R. and Maslov, Yu.I., 2004. Effects of Some Physiology Active Compounds on Development of the Assimilatory Apparatus in *Fucus vesiculosus* Vestn L. St. Petersburg. Gos. Univ., Ser. 3, Biology 4, 81–87.

Tarakhovskaya, E.R., Maslov Y.I., and Shishova M.F., 2007. Phytohormones in Algae. Russian Journal of Plant Physiology 54(2), 163–170.

Tominaga, N., Takahata, M., and Tominaga, H., 1993. Effects of NaCl and KNO₃ Concentrations on the Absciscic Acid Content of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta). *Hydrobiologia* 267, 163–168.

Torzillo, G., Masojidek, J., 2008. *Mass Cultivation of Freshwater Microalgae*. vol. Encyclopedia of Ecology 2226-2235. Sven Erik Jorgensen and Brian Fath (eds.). Oxford: Elsevier.

Trainor, F.R., 1963. Zoospores in *Scenedesmus obliquus*. *Science* 142, 1673–1674.

Trainor, F.R., Burg, C., 1965. *Scenedesmus obliquus* sexuality. *Science* 148, 1094–1095.

Urrutia, I., Sierra, J.L., and Llama, M.J., 1995. Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams. *Journal of Enzyme and Microbial Technology* 17, 200–205.

Voltolina, D., Gòmez-Villa, H., Correa, G., 2005. Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. *Bioresource Technology* 96 (3), 359–362.

Widjaja, A., Chien, C., Ju, Y., 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Taiwan Institute. Chemical Engineering* 40, 13–20.

Wijffels, R.H. and Barbosa, M.J., 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329, 796–799.

Wolf, M., Buchheim, M., Hegewald, E., Krienitz, L. & Hepperle, D., 2002a. Phylogenetic position of the *Sphaeropleaceae* (*Chlorophyta*). *Journal of Plant Systematic and Evolution* 230, 161–171.

Xin, Li, Hong-ying, Hu, Ke G., Ying-xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101, 5494–5500.

Yokoya, N.S., and Handro, W., 1996. Effects of Auxins and Cytokinins on Tissue Culture of *Grateloupia dichotoma* (*Gigartinales, Rhodophyta*). *Hydrobiologia* 326/327, 393–400.

Yoshida M., Tanabe, Y., Yonezawa, N., Watanabe, M.M., 2012. Energy Innovation Potential of Oleaginous Microalgae. *Biofuels* 3, 761-781.

Zakharychev, V.V., 1999. *Fitogormony, ikh analogi i antagonisty v kachestve gerbitsidov i regulatorov rosta rastenii* (Phytohormones, Their Analogues and Antagonists As Herbicides and Plant Growth Regulators), Moscow: RKhTU im. D.I. Mendeleeva.

Siti internet

<http://www.algaebase.org>

<http://www.biomassenergycentre.org>

http://www.enea.it/produzione_scientifica/pdf_volumi/V2010_07_FontiRinnovabili.pdf

<http://www.esrl.noaa.gov/>

<http://www.ipcc.ch/>

<http://www.rivistamissioniconsolata.it/cerca.php?azione=det&id=2681>